

ДИА•М
современная лаборатория

www.dia-m.ru
заказ on-line



Руководство по блоттингу белков Советы и приемы



О шестом издании

С публикацией шестого издания Руководства по блоттингу белков, Merck Millipore продолжает информировать исследователей о последних инновациях в области обнаружения белков. Мы ввели все-стороннее руководство по оптимизации концентрации антител и снижению фона, а также развернутые данные и протоколы для флуоресцентной детекции.

Данное руководство является совокупным опытом наших ученых-практиков, которые активно занимаются развитием науки блоттинга и обнаружения белков. Оно также включает в себя множество наиболее распространенных рекомендаций, представленных специалистами нашей технической службы, к которым обращаются за помощью ученые по всему миру.

Лучшие мембраны, лучшие блоты.

Merck Millipore является одним из ведущих поставщиков мембран для переноса в течение почти четырех десятилетий. E.M. Southern использовал эти мембраны для разработки первого переноса нуклеиновых кислот из агарозного геля в 1975 году¹. Первый 0,45 мкм PVDF-субстрат для вестерн-блоттинга, мембрана Immobilon®-P, была представлена в 1985 году, а первый 0,2 мкм PVDF-субстрат для блоттинга белка и секвенирования, мембрана Immobilon®-PSQ, появилась на рынке в 1988 году.

В дополнение к мембранам и реагентам Immobilon®, Merck Millipore предлагает широкий выбор других инструментов исследования белков, включая наборы для мягкого экстрагирования белка, быстрого выделения белка при помощи магнитных шариков PureProteome™, а также быструю и эффективную концентрацию центрифужными фильтрами Amicon® Ultra.

Где можно получить дополнительную информацию

Если у вас есть вопросы или нужна помощь, пожалуйста, свяжитесь со специалистом технической службы Merck Millipore или задайте свой вопрос на сайте:

www.merckmillipore.com/techservice

Вы также найдете ответы на часто задаваемые вопросы (FAQ) по вестерн-блоттингу и другим близким методам на сайте: www.merckmillipore.com/wb_faqs

1. Southern E. J Mol Bio 1975;98:503.

Содержание

	Введение	3
1	Выбор мембран	4
	Мембраны для переноса Immobilon® PVDF	6
2	Связывание белков	10
	Сравнение мембран для переноса Immobilon®-P и Immobilon®-p ^{5Q}	10
	Факторы, оказывающие влияние на связывание белков	11
3	3. Методы блоттинга: принципы и оптимизация	12
	Фильтрация	12
	Вестерн-блоттинг	14
	Разделение комплексных смесей белков в 1-D или 2-D гелях	14
	Маркеры молекулярной массы	15
	Концентрация полиакриламида	16
	Буферы для прогона гелей	16
	Перенос белков из геля на мембрану	16
	Способы электропереноса	16
	Буферы для переноса	18
	Функции метанола в буфере для переноса	18
	Факторы, влияющие на успешный перенос белков	19
	Присутствие додецилсульфата натрия SDS	19
	Электрический ток и время переноса	20
	pH буфера для переноса	20
	Время уравнивания	20
	Разработка нового протокола переноса	22
	Подготовка мембраны для идентификации белков	22
	Для окрашивания и иммунодетекции	22
	Для экспресс-иммунодетекции и визуализации методом трансиллюминации	22
	Хранение	22
	Визуализация белков	23
	Трансиллюминация	23
	Окрашивание	23
	Обратимое окрашивание	23
	Необратимое окрашивание	23
4	Идентификация белков	25
	Сравнение процедур стандартных и экспресс-методов иммунодетекции	25
	Факторы, оказывающие влияние на иммунодетекцию	26
	Буферы	26
	Блокирование	27
	Антитела	27
	Промывка	29
	Двойной блоттинг	29
	Субстраты для детекции	30
	Хромогенная детекция	30
	Хемилюминесцентная детекция	30
	Флуоресцентная детекция	31
	Повторное исследование с использованием Immobilon® PVDF	32
	Масс-спектрометрия	32
	Масс-спектрометрия с использованием Immobilon® PVDF	32

Содержание (продолжение)

5	Протоколы	34
	1. Протоколы переноса белков	35
	1.1. Электроперенос: Перенос в камере (влажный)	35
	1.2. Электроперенос: Полусухой перенос	36
	1.3. Дот-блоттинг/Слот-блоттинг: Метод вакуумной фильтрации	39
	1.4. Спот-блоттинг: ручной метод	40
	1.5. Оптимизация блокирующих реагентов	41
	1.6. Двойной Блоттинг для устранения NSB	43
	1.7. Методы сушки мембран	44
	2. Протоколы визуализации белков	45
	2.1. Визуализация методом трансиллюминации	45
	2.2. Визуализация обратимым окрашиванием	46
	Ponceau-S Red	46
	Медь-фталоцианинтетрасульфоновая кислота (CPTS)	46
	2.3. Визуализация необратимым окрашиванием	47
	Coomassie® Brilliant Blue R Dye	47
	Амидо-черный	47
	3. Протоколы иммунодетекции	48
	3.1. Стандартный метод иммунодетекции	48
	3.2. Экспресс-метод иммунодетекции	50
	3.3. Экспресс-метод иммунодетекции с использованием SNAP i.d.® 2.0	51
	3.4. Высокосолевая промывка для удаления постоянного фона	54
	4. Протоколы очистки мембран	55
	4.1. Очистка с помощью теплоты и детергента	55
	4.2. Очистка при низких значениях pH	56
	4.3. Очистка с помощью набора ReBlot™ Plus Western Blot Recycling Kit	56
	5. Протокол расщепления белков	57
	5.1. Расщепление белков на мембране для масс-спектрометрии	57
	6. Протокол хранения блотов	58
	6.1. Подготовка блотов для длительного хранения	58
6	Приложения	59
	Поиск и устранение неисправностей	65
	Глоссарий	66
	Литература	67
	Патенты	69
7	Информация для заказа	70

Введение

Со времени своего появления в 1979 году (Towbin с соавт., 1979) блоттинг белков стал обычным инструментом исследовательских лабораторий. Его традиционно используют для обнаружения низких концентраций белков в комплексных образцах или для контроля экспрессии и очистки белков. В самой простой процедуре блоттинга белков, известной как дот-блот или слот-блот (dot/slot blot), используется вакуумная фильтрация для переноса белка на микропористую мембрану. Хотя этот метод обеспечивает качественную информацию об общем уровне экспрессии белков и может выполняться параллельно на нескольких образцах, он не дает информации о молекулярной массе белков. Кроме того, специфичность этого метода может быть поставлена под вопрос, поскольку вместе с интактным белком могут быть обнаружены продукты разложения белка или посттрансляционно модифицированные изоформы.

Вестерн-блоттинг представляет более сложную процедуру, включающую разделение смеси белков гелем -электрофорезом с последующим электропереносом на подходящую мембрану (например, PVDF). После переноса белков на мембрану PVDF, они могут быть окрашены для визуализации и непосредственно идентифицированы методами N-концевого секвенирования, масс-спектрометрии или иммунологического анализа. Иммунодетекция включает идентификацию белка через его реакцию со специфичным антителом. За счет пространственного разрешения, этот метод обеспечивает информацию о молекулярной массе отдельных белков и различает изоформы, промежуточные продукты, и другие посттрансляционно модифицированные формы.

В клинических лабораториях эффективность иммуноблоттинга была доказана в таких областях как инфекционные и аутоиммунные заболевания, аллергия и другие (Towbin и соавт., 1989; Stahl и соавт., 2000). Вестерн-блоттинг считается надежным диагностическим тестом для подтверждения повторных реактивных результатов ТФА (ELISA) по вирусной

инфекции и представляет собой высокочувствительный однозначный и простой анализ, обеспечивающий высокую комплексность получаемой информации (Bauer, 2001; Mylonakis и соавт., 2000; Heermann и соавт., 1988).

Примеры применения вестерн-блоттинга включают анализ экспрессии белков в дрожжах количественным вестерн-анализом (Ghaemmadami и соавт., 2003), определение числа белковых реплик и компартиментализации (Rudolph и соавт., 1999), изучение конкурентного ингибирования протеинкиназы АТФ (Wang и Thompson, 2001), а также обнаружение генно-модифицированных организмов сельскохозяйственных культур и продуктов (Ahmed, 2002).

Очевидно, что блоттинг белков остается лучшей платформой поисковых исследований и до сих пор является стандартом для оценки анализа обнаружения новых антител и других белков (таких, как ELISA, анализ на основе сферических гранул, проточной цитометрии и иммуногистохимии). Тем не менее, необходимость одновременного анализа большого количества белков для характеристики сложных сетей и связанная с этим необходимость сохранения ценных образцов подталкивает современные исследования к улучшению чувствительности и скорости методов блоттинга. Метод «двойного блоттинга» (“double blotting”; Lasne, 2001, 2003) исключает ложнопозитивные реакции вследствие сильных неспецифичных взаимодействий между белками и несвязанными вторичными антителами при проведении блоттинга. Фар-вестерн блоттинг (Far-Western blotting) позволяет обнаружить специфичные взаимосвязи «белок-белок» (Grasser, 1993), а саут-вестерн-блоттинг (Southwestern blotting) используется для идентификации белков, взаимодействующих со специфичными последовательностями ДНК (Silva, 1987). Показано, что многополосный вестерн-блоттинг увеличивает пропускную способность при снижении вариабельности между блотами (Aksamitiene, 2007). Новое поколение технологии блоттинга характеризуется снижением количества белка, необходимого для получения сигнала (Swank, 2006) и методами, направленными на улучшение количественной эффективности вестерн-блоттинга (Schilling, 2005a; 2005b).

Выбор мембран

На тип мембран, используемых для блоттинга, могут влиять следующие факторы:

- Способность к связыванию белка;
- Требование по предварительному увлажнению спиртом;
- Способность выполнять многократную очистку и повторные исследования;
- Визуализация белков;
- Длительное хранение блотов;
- Соотношение сигнала и шума (фона).

Поливинилиденфторид (ПВДФ/ PVDF) и нитроцеллюлоза представляют два типа мембран, наиболее часто используемых в вестерн-блоттинге.

Использование мембран PVDF в электроблоттинге имеет много преимуществ по сравнению с нитроцеллюлозными мембранами. Мембраны PVDF лучше удерживают белок, имеют большую физическую устойчивость и широкую химическую совместимость (Pluskal, и соавт., 1986). Более высокая механическая прочность и превосходная химическая стойкость PVDF-мембран делают их идеальным инструментом при разнообразном окрашивании и повторном исследовании (тестировании) в иммунодетекции. Другое преимущество использования PVDF-мембран состоит в том, что повторные полосы из одного геля могут иметь разнообразное применение как, например, окрашивание красителем Coomassie® Blue с последующей вырезкой полосы и N-концевым секвенированием, протеолизом/разделением пептидов/внутренним секвенированием и иммунодетекцией (Kurien, et al., 2003). Типичная связывающая способность имеющихся на рынке нитроцеллюлозных мембран составляет 80–100 мкг/см², в то время как для PVDF мембран – 100-200 мкг/см².

Прямое сопоставление PVDF и нитроцеллюлозных мембран при выявлении антигенов ВИЧ в сыворотке крови показало, что мембраны PVDF лучше удерживают суммарные антигены ВИЧ и лучше обнаруживают антитела к гликозилированным K-антигенам (Lauritzen и Pluskal, 1988). Сравнение свойств нитроцеллюлозных и PVDF мембран представлено в Таблице 1

Таблица 1. Сравнение свойств и применения мембран - PVDF и нитроцеллюлозные мембраны

Свойства/применение	Нитроцеллюлозные	PVDF
Физическая стойкость	Слабая	Хорошая
Способность связывать белки	80 – 100 мкг/см ²	100 – 300 мкг/см ²
Устойчивость к растворителям	Нет	Да
Вестерн-перенос	Да	Да
Общее окрашивание белков	Коллоидное золото	Коллоидное золото
	Ponceau-S red	Ponceau-S red
	Амидо-черный	Амидо-черный
	Тушь	Тушь
	Sypro® для окрашивания блотов	Краситель Coomassie® Blue
Обнаружение	Хромогенное	Хромогенное
	Хемилюминесцентное	Хемилюминесцентное
	Флуоресцентное	Флуоресцентное
	Радиоактивное	Хемифлуоресцентное Радиоактивное
Метод двойного блоттинга	Нет	Да
Экспресс-иммунодетекция	Нет	Да
Повторное исследование-вестерн	Да	Да
Секвенирование по Эдману	Нет	Да
Анализ аминокислот	Да	Да
Связывание в присутствии SDS	Слабое	Хорошее
Расщепление на мембране или масс-спектрометрия	Нет	Да
Прямой анализ MALDI-TOF MS	Нет	Да
Архивация данных	Нет	Да

Мембраны для переноса Immobilon® PVDF

- Merck Millipore предлагает три типа PVDF мембран: Мембраны для переноса Immobilon® поставляются в рулонах и нарезанными листами. Предварительно нарезанные мембраны совместимы со всеми сборными гелями и с большинством коммерческих систем гель-электрофореза, доступных на рынке. Свойства мембран для переноса Immobilon® представлены в Таблице 2. В Таблице 3 (стр. 8) дается сопоставление размеров предварительно нарезанных листов мембран Immobilon® с большинством наиболее распространенных систем электрофореза. В Таблице 4 (стр. 9) дается сопоставление размеров нарезанных листов мембран Immobilon® с доступными имеющимися в продаже сборными гелями.
- **Мембрана Immobilon®-P** (0,45 мкм) – универсальный субстрат, который хорошо подходит для обычных задач иммуноблоттинга.
 - **Мембрана Immobilon®-p⁵⁰** (0,2 мкм) – идеальна для секвенирования белков и иммуноблоттинга нуклеиновых кислот. Она имеет более высокую способность связывания белков и более высокую степень их удерживания, по сравнению с мембранами 0,45 мкм.
 - **Мембрана Immobilon®-FL** (0,45 мкм) была разработана для иммунодетекции на основе флуоресцентных методов. Она имеет очень низкую фоновую флуоресценцию в широком диапазоне волн возбуждения и излучения.



Таблица 2. Свойства и применение мембран для переноса Immobilon® PVDF

	Immobilon®-P	Immobilon®-P ⁵⁰	Immobilon®-FL
Описание	Оптимизирована для связывания белков, перенесенных с различных гель-матриц	Однородная структура пор обеспечивает превосходное связывание белков с ММ <20 кДа	Оптимизирована для применения в флуоресцентной иммунодетекции
Состав	PVDF	PVDF	PVDF
Размер пор	0,45 мкм	0,2 мкм	0,45 мкм
Фобность	Гидрофобная	Гидрофобная	Гидрофобная
Применение	Вестерн блоттинг Анализ связывания Анализ аминокислот N-концевое секвенирование белков Дот/слот блоттинг Визуализация гликопротеинов Анализ липополисахаридов Масс-спектрометрия	Блоттинг низкомолекулярных белков Вестерн блоттинг Анализ аминокислот Масс-спектрометрия N-концевое секвенирование белков	Вестерн блоттинг Дот/слот блоттинг Флуоресцентная иммунодетекция
Методы обнаружения	Хромогенный	Хромогенный	Флуоресцентный
	Хемифлуоресцентный	Флуоресцентный	Chromogenic
	Хемилюминесцентный	Хемифлуоресцентный	Хемифлуоресцентный
	Радиоактивный	Хемилюминесцентный Радиоактивный	Хемилюминесцентный
Способность связывать белки	Инсулин: 160 мкг/см ²	Инсулин: 262мкг/см ²	Инсулин: 155 мкг/см ²
	BSA: 215 мкг/см ²	BSA: 340 мкг/см ²	BSA: 205 мкг/см ²
	Козий IgG: 294 мкг/см ²	Козий IgG: 448 мкг/см ²	Козий IgG: 300 мкг/см ²
Совместимое окрашивание - обратимое	Трансиллюминация	Трансиллюминация	Трансиллюминация
	Ponseau-S	Ponseau-S	Ponseau-S
	CPTS	CPTS	CPTS
	Толуидиновый синий	Толуидиновый синий	Sypro® для блотов
	Sypro® для блотов	Sypro® для блотов	
Совместимое окрашивание - необратимое	краситель Coomassie® Brilliant Blue	краситель Coomassie® Brilliant Blue	краситель Coomassie® Brilliant Blue
	Амидо-черный	Амидо-черный	Амидо-черный
	Тушь	Тушь	
	Коллоидное золото	Коллоидное золото	

Таблица 3. Размеры листов мембран для переноса Immobilon® PVDF и их соответствие системам электрофореза.

Производитель	Вертикальная камера	Размеры геля (см)	Immobilon® Size (см)	Immobilon®-P 0,45 мкм	Immobilon®-p ⁵⁰ 0,2 мкм	Immobilon®-FL 0,45 мкм*
GE Healthcare	SE 250 Mighty Small™ SE	8 x 7	8,4 x 7	IPVH07850	ISEQ07850	
	260 Mighty Small™ miniVE	8 x 9,5	8 x 10	IPVH08100	ISEQ08100	
	miniVE	8 x 9,5	8 x 10	IPVH08100	ISEQ08100	
	SE 400	10 x 10	10 x 10	IPVH10100	ISEQ10100	IPFL10100
	SE 600	14 x 16	15 x 15	IPVH15150	ISEQ15150	
	SE 600	14 x 16	15 x 15	IPVH15150	ISEQ15150	
	SE 600	14 x 8	13,5 x 8,5	IPVH08130	ISEQ08130	
Bio-Rad	Mini-PROTEAN® 3, Mini-PROTEAN® 3 Dodeca™	8,3 x 7,3	8,4 x 7	IPVH07850	ISEQ07850	
	Criterion™, Criterion™ Dodeca™	13,3 x 8,7	13,5 x 8,5	IPVH08130	ISEQ08130	
	PROTEAN® II xi	16 x 16	15 x 15	IPVH15150	ISEQ15150	
	PROTEAN® II xi	16 x 20	26,5 x 37,5	IPVH00010	ISEQ00010	IPFL00010
	PROTEAN® II XL	19,3 x 18,3	20 x 20	IPVH20200	ISEQ20200	IPFL20200
	PROTEAN® Plus Dodeca™	20 x 20,5	26 x 26	IPVH304F0	ISEQ0304F0	
	Mini-PROTEAN® II	8,3 x 7,3	8,4 x 7	IPVH07850	ISEQ07850	
	XCell SureLock™ Mini-Cell, XCell6™ MultiGel	8 x 8	8,4 x 7	IPVH07850	ISEQ07850	
	P81 Purfin™, P82 Wolverine™, P8DS Emperor Penguin™	10 x 10	10 x 10	IPVH10100	ISEQ10100	IPFL10100
	P8DS Emperor Penguin™	8 x 10	8 x 10	IPVH08100	ISEQ08100	
Thermo Scientific	P9DS Emperor Penguin™	16 x 16	15 x 15	IPVH15150	ISEQ15150	
	P10DS Emperor Penguin™	20 x 20	20 x 20	IPVH20200	ISEQ20200	IPFL20200

Таблица 4. Размеры листов мембран для переноса Immobilon® PVDF и их соответствие сборным гелям

Производитель	Название сборного геля	Размер геля (см)	Immobilon® Size (см)	Immobilon®-P 0,45 мкм	Immobilon®-P ⁵⁰ 0,2 мкм	Immobilon®-FL 0,45 мкм*
Bio-Rad	Ready Gel® Criterion™ PROTEAN Ready	8,3 x 7,3	8,4 x 7	IPVH07850	ISEQ07850	
	Gel® PROTEAN Ready Gel® PROTEAN	13,3 x 8,7	13,5 x 8,5	IPVH08130	ISEQ08130	
	Ready Gel® PAGE®	16 x 16	15 x 15	IPVH15150	ISEQ15150	
	PAGE®	19,3 x 18,3	20 x 20	IPVH20200	ISEQ20200	IPFL20200
	MicroGel®	20 x 20,5	26 x 26	IPVH304F0	ISEQ304F0	
Cambrex	igels™	9 x 10	8 x 10	IPVH08100	ISEQ08100	
	LongLife Gels NuPAGE®	10 x 10	10 x 10	IPVH10100	ISEQ10100	IPFL10100
Gradipore	Novex®	8 x 2,5	8 x 10 (cut in 1/2)	IPVH08100	ISEQ08100	
	Zoom®	8 x 5,8	8 x 10 (cut in 1/2)	IPVH08100	ISEQ08100	
	E-Gel®	8 x 5,8	8 x 10 (cut in 1/2)	IPVH08100	ISEQ08100	
Invitrogen	Precise Protein Gels	8 x 8	8,4 x 7	IPVH07850	ISEQ07850	
		8 x 8	8,4 x 7	IPVH07850	ISEQ07850	
		8 x 8	8,4 x 7	IPVH07850	ISEQ07850	
		13,5 x 10,8	13,5 x 8,5	IPVH08130	ISEQ08130	
Thermo Scientific		8 x 5,8	8 x 10 (cut in 1/2)	IPVH08100	ISEQ08100	

* Все размеры могут быть нарезаны из рулонов мембраны Immobilon®-FL membrane (IPFL00010).

Связывание белков

PVDF представляет собой гидрофобный полимер, который не смачивается в водных растворах. Для того, чтобы использовать мембрану PVDF с водными буферами и системами, необходимо сначала смочить ее в 50% (по объему), или выше, растворе спирта. Для смачивания мембраны можно использовать метанол, этанол и изопропанол. Полное смачивание определяется изменением внешнего вида мембраны, от непрозрачного до полупрозрачного. Спирт удаляют из мембраны обильным промыванием водой, и после этого мембрану можно непосредственно уравнивать в буфере для переноса.

Различие в связывании между мембранами для переноса Immobilon®-P и Immobilon®-P^{5Q}

После того как мембрана увлажнена, связывание белков может произойти простым контактом белка с мембраной. Поскольку связывание происходит по всей глубине мембраны, ее связывающая способность определяется площадью внутренней поверхности пор (Mansfield, 1994). Площадь внутренней поверхности мембраны для переноса Immobilon®-P^{5Q} примерно в три раза выше, чем у мембраны для переноса Immobilon®-P, что приводит к более высокой адсорбционной способности. Значения, представленные в Таблице 2, показывают верхний предел связывания белков после насыщения поверхности мембраны в неденатурирующем буфере. Можно ожидать, что в любом варианте применения мембрана для переноса

Immobilon®-P^{5Q} будет связывать больше белков, чем мембрана для переноса Immobilon®-P. Однако максимально достижимое связывание будет зависеть от конкретных используемых протоколов, вследствие различий в структурной конформации белков, химическом составе используемых буферов, а также ограничений методов, применяемых для нанесения образца.

Пример различий связывания белков между мембранами для переноса Immobilon®-P и Immobilon®-P^{5Q} показан на Рисунке 1 для случая электропереноса белков в полиакриламидном геле (ПААГ). Фракции белков, прошедшие через мембрану Immobilon®-P, были адсорбированы на второй мембране, которая была помещена вслед за первой. И, наоборот, все белки были связаны мембраной Immobilon®-P^{5Q} и не прошли через нее. В данном случае, более плотная структура пор и большая площадь внутренней поверхности полимера способствует полной адсорбции всех переносимых белков. Однако иммунодетекция на мембране для переноса Immobilon®-P^{5Q} может привести к повышенному показателю фона и потребовать более тщательных условий промывки. Таким образом, выбор мембраны обусловлен целью эксперимента: использовать мембрану для переноса Immobilon®-P для более высокой чувствительности обнаружения белков >20 кДа, и переключаться на мембрану для переноса Immobilon®-P^{5Q}, если необходим анализ более низкомолекулярных белков или 100 %-ный захват белков для секвенирования пептидов.

Факторы, оказывающие влияние на связывание белков

Адсорбция белков на молекулярном уровне происходит, по крайней мере, отчасти, в результате взаимодействия гидрофобных боковых цепочек аминокислот и гидрофобных доменов с поверхностью полимера. Matsudaira (1987) наблюдал снижение эффективности секвенирования малых пептидов на 80% после расщепления гидрофобных осадков, что, вероятно, было связано с вымыванием остатков пептидов. Кроме того, при расщеплении пептидов было отмечено, что гидрофобные пептиды зачастую элюируют через мембрану не так эффективно, как большинство гидрофильных пептидов (например, Iwamatsu, 1991; Fernandez и соавт., 1992). McKeon и Lyman (1991) показали, что добавление ионов кальция Ca^{2+} к буферу переноса повышает связывание калмодулина с мембраной для переноса Immobilon®-P. Связывание кальция приводит к образованию гидрофобного кармана в структуре молекул.

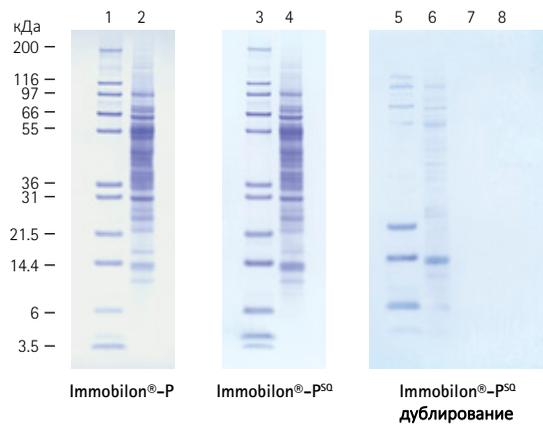


Рисунок 1.

Пролонгированный электроперенос белков с использованием мембран для переноса Immobilon®-P и Immobilon®-P⁵⁰. Стандарты молекулярной массы (дорожки 1, 3, 5, 7) и лизат печени телят (дорожки 2, 4, 6, 8) были перенесены на мембраны Immobilon®-P или Immobilon®-P⁵⁰ методом переноса в камере и окрашены - Coomassie® Blue. Пластинку мембраны Immobilon®-P⁵⁰ помещали за первой мембраной, чтобы захватывать белки, прошедшие сквозь нее (дорожки 5 и 6 позади Immobilon®-P; дорожки 7 и 8 позади Immobilon®-P⁵⁰).

Методы блоттинга:

принципы и оптимизация

Фильтрация

Фильтрация представляет собой метод прямого нанесения белков на мембрану. Растворенный образец фильтруется через мембрану применением вакуума. Белки адсорбируются на мембрану, а другие компоненты образца проходят сквозь нее за счет создания вакуума (Рис.2). При другом способе образец наносят прямо на поверхность мембраны, после чего ему дают высохнуть. После этого белки, иммобилизованные на мембране, можно анализировать.

Дот-блоттинг (dot blotting, Рис.3.) и слот-блоттинг (slot blotting) представляют собой два варианта метода фильтрации, которые используют коллекторы, позволяющие нанести образцы на мембрану по двум схемам (через точечные или щелеобразные отверстия). Эти методы можно использовать для качественной оценки при быстром скрининге (экспресс-диагностике) большого количества образцов или как количественный метод анализа однотипных образцов. Это особенно полезно для тестирования параметров дизайна эксперимента, которые будут использованы при более сложных анализах.

Другой модификацией метода фильтрации является сетка иммуноблоттинга – метод, анализа высоко параллельных образцов в тех случаях, когда объем образца чрезвычайно ограничен, а анализ не может быть выполнен обычными методами, например, ELISA. Так, сетку иммуноблоттинга использовали для

характеристики ответной реакции аллерген-специфического антитела с минимальным количеством сыворотки крови пациента (Reese и соавт., 2001).

При подготовке блотов методами фильтрации необходимо учитывать следующее:

- объем образца должен быть достаточно большим, чтобы покрывать мембрану в каждой лунке, но не должен содержать избыточного количества белков по соотношению со связывающей способностью мембраны.
- Детергенты могут ингибировать адсорбцию белков на мембране. Буферы, используемые для разведения образцов и промывки, должны содержать не более 0,05% детергента, и только в тех случаях, когда это необходимо.
- Образцы с высоким содержанием частиц могут забивать отверстия мембран, а в образцах с высокой вязкостью скорость потока будет снижена. Частицы необходимо удалить из образцов путем предварительной фильтрации или центрифугирования, и наносить на мембрану только супернатант. Вязкие образцы следует разводить в буфере.

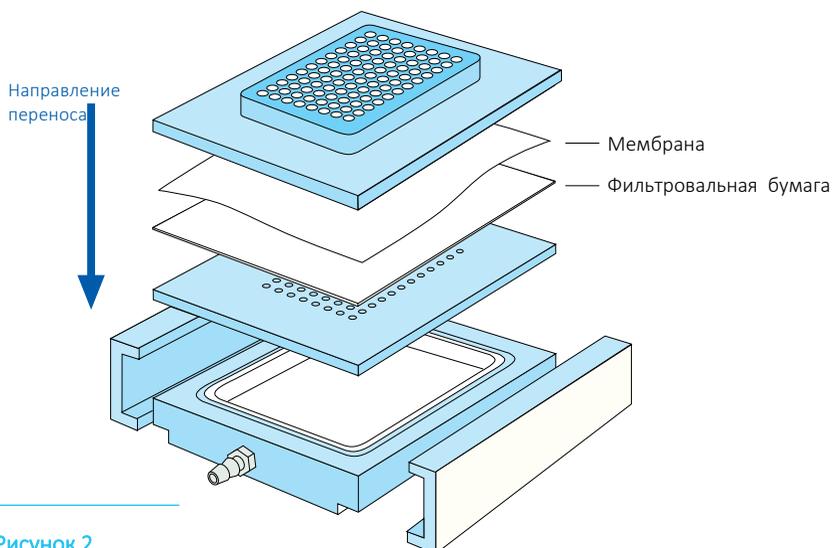


Рисунок 2
Системы блоттинга, использующие фильтрацию

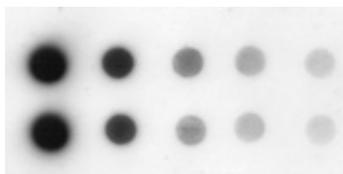


Рисунок 3.
Обнаружение трансферрина на спот-блоте человеческой сыворотки (см. Протокол 1.4. Спот-блоттинг, стр. 40) на подложке Immobilon® Western Chemiluminescent HRP. Обнаружение трансферрина проводили в двух повторностях на серийных разведениях сыворотки антител к козьему трансферрину (разведение 1:10,000) и кроличьих вторичных антител, конъюгированных с анти-gHRP (разведение 1:50000) на мембрану Immobilon®-P.

Вестерн-блоттинг

Вестерн-блоттинг состоит из следующих этапов:

- Разделение образца смеси белков в полиакриламидном геле (ПААГ).
- Перенос разделенных белков на мембрану.
- Идентификация конкретного белка на мембране.

Для успешного вестерн-блота должны соблюдаться 4 требования:

- Элюция из геля – белок должен элюировать из геля в процессе переноса. Если он не удерживается гелем, то он и не будет доступен для анализа на блоте.
- Адсорбция на мембране – белок должен адсорбироваться на мембрану в процессе переноса. Если белок не адсорбируется, то он и не будет доступен для анализа на блоте.
- Удерживание в ходе процессинга – белок должен оставаться адсорбированным на мембране в течение обработки блота после переноса.
- Доступность в ходе процессинга - адсорбированный белок должен быть доступен для воздействия химических реагентов, используемых для его обнаружения. Если белок замаскирован, то его нельзя будет обнаружить.

В следующих разделах приводится обсуждение теоретических и практических соображений по протоколам, относящимся к вестерн-блоттингу.

Разделение комплексных смесей белков в 1-D или 2-D гелях

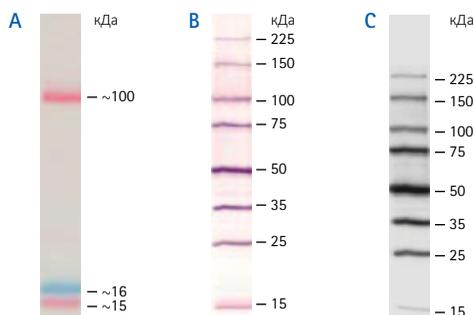
Наиболее обычным способом разделения сложных белковых смесей перед процессом блоттинга является одномерный (1-D) электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецил сульфата натрия (SDS-PAGE), в ходе которого происходит разделение белков по молекулярной массе (Рис. 4). В некоторых случаях разделение нативных белков проводят в неденатурирующих условиях. Хотя данный метод обычно не достигает уровня разрешения денатурирующего электрофореза, он может быть особенно полезен в тех случаях, когда первичные антитела распознают только неденатурированные белки, или когда нужно сохранить биологическую активность белка на мембране.

Двумерный (2-D) гель-электрофорез является предпочтительным методом анализа белкового состава разных типов клеток, тканей и жидкостей и является ключевой технологией протеомики. Иммуноблоттинг двумерных гелей предоставляет информацию о молекулярной массе и изоэлектрической точке, и может быть полезен при различении изоформ белка, полученных в результате пост-трансляционных модификаций (Celis and Gromov, 2000). В некоторых случаях фенотипирование белка иммуноблоттингом может быть получено только после 1-D разделения изоэлектрофокусированием. Пример 2-D блота представлен на Рисунке 5.

Маркеры молекулярной массы

Включение в гель стандартов молекулярной массы (MW), или маркеров, помогает оценить размеры исследуемых белков (представляющих особый интерес) после их разделения в электрофорезе. Имеются 2 типа маркеров: неокрашенные и предварительно окрашенные. Неокрашенные маркеры MW обычно состоят из смеси очищенных нативных или рекомбинантных белков определенной молекулярной массы. Для визуализации их местонахождения на геле или на мембране необходимо включить в обработку этап окрашивания.

Предварительно окрашенные маркеры MW показаны на Рисунке 4. Их использование имеет свои преимущества и недостатки. Предварительно окрашенные маркеры позволяют отслеживать разделение белков в геле в ходе электрофореза. Они также показывают эффективность переноса в последующих этапах блоттинга. Однако они относительно дороги, а добавление красителей может сказаться на мобильности белков. Предварительно окрашенные маркеры могут показывать менее точные результаты при определении молекулярной массы, поскольку красители, соединяющиеся с белками, могут изменять их способность адсорбироваться на мембрану во время блоттинга.



А Неокрашенный гель и вестерн-перенос

В AP вестерн-блот (S- белок AP конъюгат) колориметрическое обнаружение

С AP вестерн-блот (S- белок AP конъюгат) хемиллюминесцентное обнаружением

Рисунок 4.

С помощью трех предварительно окрашенных маркеров и восьми неокрашенных маркеров (с метками His tag и S-Tag), белковые маркеры Trail Mix™ (Кат.№ 70982) позволяют прямую визуализацию миграции белков при электрофорезе и точные размеры для всех вестерн-блотов.

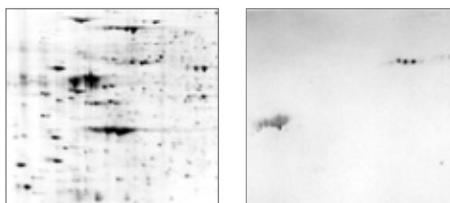


Рисунок 5.

Хемиллюминесцентная детекция белков, разделенных в двумерном электрофорезе. Окрашенный серебром 2-D гель, клеточная линия фибробластов крыс (слева) и блот того же геля (справа), тестирован мышинными моноклональными антителами и визуализирован хемиллюминесценцией на мембране Immobilon®-P.

Концентрация полиакриламида

Концентрация полиакриламида в геле может быть распределена гомогенно или градиентно. Наиболее распространенная концентрация полиакриламида (10%), наилучшим образом подходит для разделения белков в диапазоне 10-150 кДа. Если необходимо анализировать неизвестные белки или желателен более широкий диапазон разделения, рекомендуется использовать градиентные гели. Например, для белков в диапазоне 30-200 кДа подходят 4–12% трис-глициновые гели, а 10-20% гели успешно разделяют белки в диапазоне 6-150 кДа. Гели SDS-PAGE обычно имеют толщину 1,0–1,5 мм; однако для целей блоттинга лучше переносить белки в тонких гелях (1 мм).

Буферы для прогона гелей

Наиболее распространенные буферы для прогона гелей содержат Трис-глицин или Трис-трицин. Буферы могут включать 0,1% детергента, обычно SDS. Буферные системы на основе Трис-глицина эффективно разделяют белки в широком диапазоне молекулярных масс (6-200 кДа) и совместимы с денатурирующими или неденатурирующими условиями. Системы на основе Трис-глицина лучше подходят для разделения более низкомолекулярных белков (<10 кДа), которые необходимо редуцировать и денатурировать перед загрузкой в гель. Обе буферные системы совместимы с переносом белка на мембраны PVDF. Для разделения более крупных белков иногда используются Трис-ацетатные буферы.

Перенос белков из геля на мембрану

Процесс переноса белков из геля на мембрану, при сохранении их относительного положения и разрешения, известен под названием блоттинга. Блоттинг можно проводить тремя различными способами:

- Методом простой диффузии (Kurien и Scofield, 1997), при котором мембрану помещают поверх геля со стопкой сухой фильтровальной бумаги поверх мембраны и помещают груз на фильтровальную бумагу для обеспечения процесса диффузии. Этот метод можно использовать для переноса белков из одного геля на несколько мембран (Kurien и Scofield, 1997) и получения нескольких импринтов одного и того же геля. Основной недостаток метода диффузии состоит в том, что перенос не является количественным и происходит перенос только 25-50% белков, по сравнению с электроблоттингом (Chen и Chang, 2001).

- Поток сольвентов, индуцированный вакуумом (Peferoen и соавт., 1982), использует силу всасывания насоса для перетягивания выделенных белков из геля на мембрану. Этим методом можно переносить как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные белки; однако для белков с молекулярной массой <20 кДа требуются мембраны с меньшим диаметром пор (0,2 мкм), поскольку они хуже адсорбируются мембраной 0,45 мкм (Kurien, 2003). Вакуумный блоттинг белков из полиакриламидного геля в основном, для переноса нуклеиновых кислот из агарозных гелей.

- Элюция в процессе электрофореза, или электроперенос (Towbin и соавт., 1979), является в настоящее время самым распространенным методом переноса. Его основные преимущества – скорость и полнота переноса, по сравнению с диффузией или вакуумным блоттингом (Kurien и соавт., 2003).

Способы электропереноса

Два общепринятых метода электропереноса – перенос в камере и полусухой перенос. Оба основаны на одинаковых принципах и отличаются между собой только механическими приборами для закрепления пакета гель-мембрана, а также в применении электрического поля.

Перенос в камере (Рис.6) является традиционным методом, при котором пакет гель-мембрана полностью погружают в резервуар с буфером, после чего включают ток. Это эффективный, но медленный метод, использующий большие объемы буфера. Системы камер для переноса обычно работают при постоянном напряжении; перемешивание буфера в процессе переноса поддерживает относительно постоянный ток

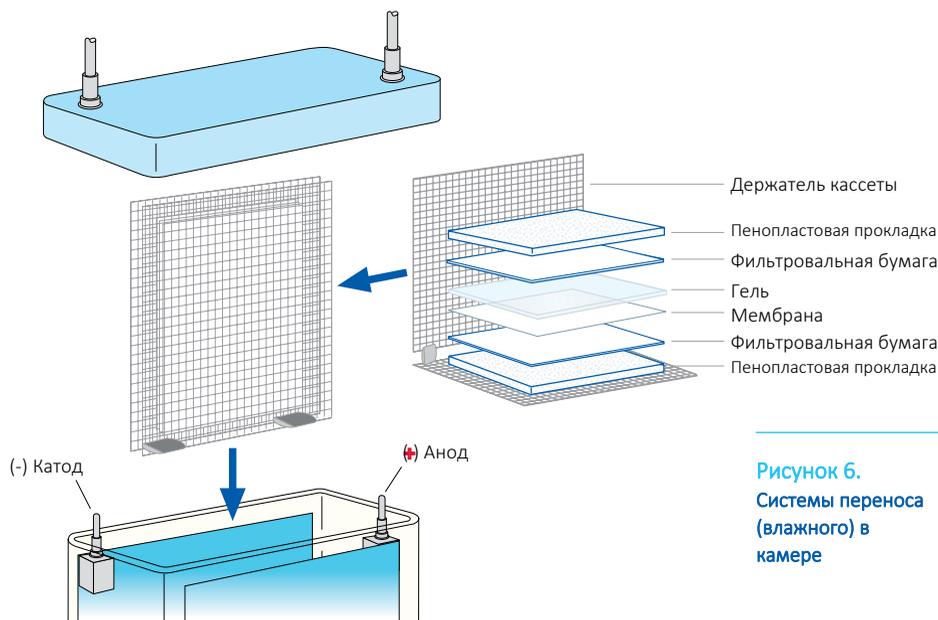


Рисунок 6.
Системы переноса
(влажного) в
камере

В методе полусухого переноса (Рис.7) буферный резервуар заменяют слоями фильтровальной бумаги, смоченными в буферном растворе. Поскольку пластины электродов находятся в прямом контакте с фильтровальной бумагой, напряженность поля в геле увеличивают до максимума для быстрого и полного переноса белков. Этот способ эффективен и выполняется намного быстрее (15-45 минут), чем перенос в камере. В большинстве методик полусухого переноса используют несколько (более одной) буферных систем для получения полного переноса как высоко-, так и низкомолекулярных белков. Однако полусухие системы блоттинга имеют меньшую буферную емкость и поэтому неприменимы для более длительных процессов переноса. Полусухой перенос является

предпочтительным методом блоттинга больших 2-D гелей. Полусухой блоттинг обычно ведут при постоянной силе тока; в ходе процесса напряжение увеличивают.

Для систем полусухого переноса важно, чтобы нарезанные листы фильтровальной бумаги и мембраны были одинакового размера с гелем, чтобы ток мог свободно перемещаться в геле. В противном случае ток будет замыкаться на перекрывающихся краях фильтровальной бумаги по краям геля. В обоих типах систем переноса следует соблюдать особую осторожность для предотвращения попадания воздушных пузырьков между слоями фильтровальной бумаги, геля и мембраны. Застывшие пузырьки препятствуют переносу и вызывают появление «пустых пятен» (то есть участков не-переноса) на блоте

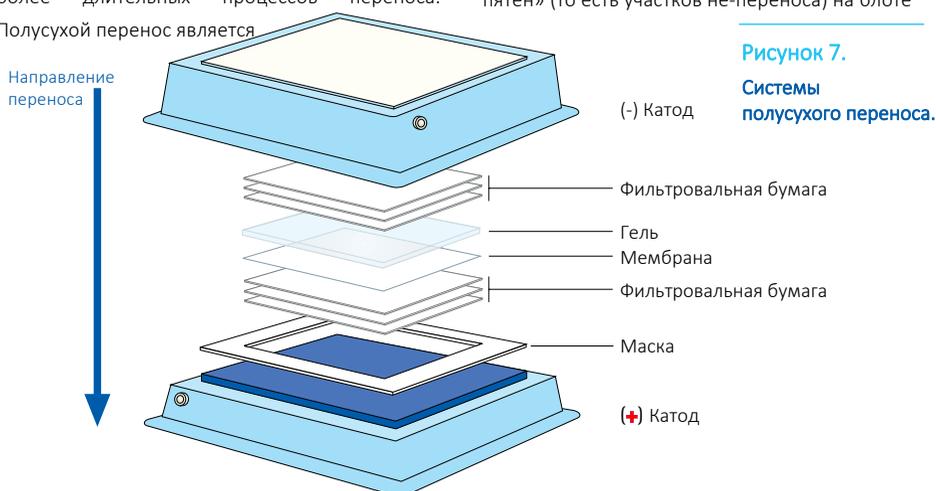


Рисунок 7.
Системы
полусухого переноса.

Застывшие пузырьки препятствуют переносу и вызывают появление «пустых пятен» (то есть участков не-переноса) на блоте.

Буферы для переноса

Буфер для переноса обеспечивает электрическую непрерывность между электродами и должен быть кондуктивным. Он также обеспечивает химическую среду, которая поддерживает растворимость белков, не препятствуя адсорбции белков с мембраны при переносе. Часто смеси обеспечивают эти функции для большинства протеинов. Большинство буферов подвержены Омическому нагреву во время переноса. Поэтому, многие системы переноса оборудованы встроенными катушками охлаждения. Камеры могут также быть помещены в холодной комнате, а буфер может быть охлажден перед использованием. В полусухих системах переноса электродные пластины служат теплоотводами. Их возможности тепловыделения ограничены, и полусухие системы обычно не используются в течение длительных переносов.

Традиционные трансферные буферы состоят из буферной системы и метанола. В системах с камерами наиболее часто используют трис-глициновый буфер Таубина (1979). Значение pH этого буфера (8,3) находится выше изоэлектрической точки (pI) большинства белков. Белки, которые были разделены на геле, имеют отрицательный суммарный заряд и мигрируют к аноду. Поскольку буфер перемешивается в камере, распределение ионов остается относительно постоянным во время переноса.

Полусухие системы могут работать с одно- или трехбуферными системами (установлено Kuhse-Anderson, 1984). Три буфера используются потому, что перенос представляет изотаксофоретический процесс, в котором белки мобилизованы между лидирующим и запаздывающим ионами (Schafer-Nielsen и соавт., 1980). В некоторых случаях трехбуферная

система обеспечивает лучший количественный перенос. Эти три следующих буфера:

- Анодный буфер I: 0,3 М Трис, pH 10,4
- Анодный буфер II: 25 мМ Трис, pH 10,4
- Катодный буфер: 25 мМ Трис и 40 мМ ϵ -аминокапроновой кислоты, pH 9,4.

Анодный буфер I нейтрализует избыток протонов, образующихся на поверхности анодной пластины. Анодный буфер II содержит Tris того же значения pH, что и анодный буфер I, но при пониженной концентрации 25 мМ. Катодный буфер содержит ϵ -аминокапроновую кислоту, которая выполняет функцию перемещения иона во время переноса и выводится из катодного буфера при миграции через гель по направлению к аноду. Смотрите рекомендации производителя для одиночных буферов в полусухих системах.

Несмотря на то, что вышеуказанные буферные системы подходят для большинства случаев трансфера протеинов, в литературе приводятся многочисленные модификации для различных применений. Одной из наиболее значимых модификаций является применение 10 мМ буфера CAPS при pH 11, рекомендованное для секвенирования протеинов (Matsudaira, 1987). Используемый в буфере Таубина глицин при переносе через гель вызывал высокий уровень фона в автоматизированных секвенаторах, в которых использовались химические принципы метода Эдмана. При изменении состава буфера переноса этот артефакт был значительно снижен. Любое изменение силы и композиции буфера следует осуществлять с осторожностью, чтобы исключить перегрев блока переноса.

Функции метанола в буфере для переноса

Метанол, добавляемый в буферы для переноса, имеет две основные функции:

- Стабилизирует размеры геля.
- Удаляет додецилсульфат натрия (SDS) из комплекса с белковыми молекулами.

Полиакриламид – это гидрогель, который обладает способностью поглощать воду. В чистой воде размер геля значительно увеличивается по всем измерениям. Степень набухания также зависит от концентрации акриламида в геле. Высококонцентрированные гели увеличиваются в размерах значительно больше, чем низкоконцентрированные. Это свойство особенно резко выражено в градиентных гелях, в которых более концентрированная нижняя зона расширяется гораздо больше, чем верхняя. Исходно прямоугольный гель может приобрести трапециевидную форму. При добавлении метанола в буфер переноса набухание геля минимизируется, поэтому протоколы переноса обычно включают этап уравнивания для достижения размерной стабильности. При концентрации метанола от 10% до 20% стабильность размеров может быть достигнута достаточно быстро. При более низких концентрациях метанола времени на уравнивание требуется больше. Если изменение размеров происходит в ходе переноса, разделение белков может быть потеряно. Для высокомолекулярных белков с ограниченной растворимостью в метаноле, исключение метанола может привести к значительному увеличению эффективности переноса белков, однако это также может потребовать более длительного времени уравнивания для обеспечения стабильности размеров.

Вторая функция метанола имеет решающее значение для переноса белков из гелей, содержащих додецилсульфат натрия (SDS). Метанол помогает отделить SDS, который образует комплексы с молекулами белка (Mozdzanowski и Speicher, 1992). Хотя SDS необходим для разделения отдельных белков на геле, он может оказывать чрезвычайно негативное влияние на эффективность блоттинга. Во-первых, за счет придания высокой плотности отрицательного заряда молекуле белка, SDS вызывает очень быстрое прохождение белковой молекулы через мембрану, сокращение времени ее нахождения вблизи структуры пор и минимизирует возможность молекулярного взаимодействия. Во-вторых, за счет обволакивания белковой молекулы, SDS ограничивает возможность ее молекулярного контакта с PVDF. SDS

Эти эффекты усиливаются по мере снижения молекулярной массы белков. Метанол сокращает оба эффекта путем удаления SDS и увеличения вероятности связывания молекулы белка с мембраной.

Факторы, влияющие на успешный перенос белков.

Присутствие додецилсульфата натрия (SDS).

В некоторых исследованиях было высказано предположение, что в условиях электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле, белки связываются с молекулами SDS и поэтому не способны прочно связываться с мембраной для переноса. В частности, данные двухчасового мониторинга переноса BSA (бычий сывороточный альбумин) в стандартной системе для переноса свидетельствуют, что в пределах одной полосы белка существует несколько вариаций молекул, переходящих из геля. (Рисунок 8, стр. 19). Около 90% BSA элюировало из геля в течение первых 60 минут, а еще 7% - в течение последующих 60 минут. В течение первых 15 минут часть элюата BSA адсорбировалась на мембрану для переноса Immobilon®-P, в то время как оставшаяся часть прошла через мембрану для переноса Immobilon®-P^{5Q} и адсорбировалась на нее. BSA, который элюировал через 15 минут, адсорбировался практически полностью на лист мембраны для переноса Immobilon®-P.

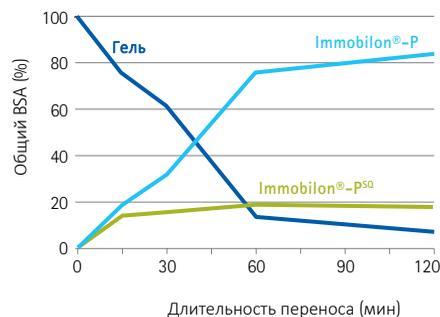


Рисунок 8.

Электроперенос BSA. 25 пиколей меченого 125I BSA проводили через SDS-PAGE в 10- 20% градиентном геле. После уравнивания в течение 5 минут BSA перенесли на мембрану Immobilon®-P и дублировали мембраной Immobilon®-P^{5Q} в камере переноса, в качестве буфера системы переноса использовали 25 мМ Трис, 192 мМ глицина и 10 % метанола. Систему запускали при 8 В/ см межэлектродном расстоянии. Через 15, 30, 60 и 120 минут гель/мембранную кассету вынимали и окрашивали. Вырезали полосы BSA и делали подсчет.

Самым простым объяснением может быть то, что BSA связывался с высоким содержанием остаточного SDS, быстро элюировавшего из геля и был неспособен адсорбироваться на мембрану для переноса Immobilon®-P. BSA, который элюировал медленнее, мог адсорбироваться на мембрану для переноса Immobilon®-P.

Хотя удаление SDS из геля обычно представляет наилучший подход в рутинном блоттинге, существуют случаи, когда целесообразно добавление небольших количеств SDS в буфер для переноса – например, когда переносимые белки имеют низкую растворимость в отсутствие SDS. Белки, связанные с клеточными мембранами или интегрированные в них, могут отличаться значительной гидрофобностью и осаждаться в полиакриламид при удалении SDS. Высокомолекулярные белки также могут иметь проблемы с растворимостью в отсутствие SDS, особенно в условиях денатурирования в буфере геля и при использовании метанола в буфере для переноса. Добавление SDS в буфер для переноса может обеспечить приемлемую растворимость и, соответственно, элюцию из геля (например, Towbin и Gordon, 1984; Otter и соавт., 1987; Bolt и Mahoney, 1997). Концентрация SDS в буфере для переноса не должна превышать 0.05%, и следует выделить достаточно времени для уравнивания и полного удаления избытка SDS из геля.

Другие приемы, используемые для улучшения эффективности переноса высокомолекулярных белков, включают удлинение процесса блоттинга до 21 часа (Erickson и соавт., 1982) или использование композитных агарозных-полиакриламидных гелей, содержащих SDS и мочевины (Elkon и соавт., 1984)

Электрический ток и время переноса

Правильный подбор параметров электрического тока и времени переноса действие имеют решающее значение для успешной блоттинга. Недостаточное действие тока или время переноса приведут к неполному переносу. И наоборот, если сила тока слишком высокая, молекулы белка будут мигрировать через мембрану слишком быстро для того, чтобы успеть адсорбироваться. Это может представлять значительную проблему для небольших белков. Обычно системы блоттинга комплектуются рекомендациями производителя по параметрам тока и времени переноса,

Может также потребоваться оптимизация, в зависимости от процентного содержания акриламида, состава буфер и молекулярной массы исследуемого белка. Как правило, большее время переноса лучше соответствует системам с камерой (tank systems), которые обычно предусматривают охлаждение блока и внутреннюю рециркуляцию буфера для переноса. Однако, при полусухом переносе удлинение времени блоттинга может привести к истощению буфера, перегреву и высыханию геля. Если высыхание происходит слишком часто, то, скорее всего, имеет место повреждение устройства дуговым пробоем между электродами.

pH буфера для переноса

Еще одним важным фактором является значение pH буфера для переноса. Если изоэлектрическая точка белка равна pH буфера, перенос не будет происходить. Чтобы решить эту проблему, могут быть использованы буферы с более высоким pH, такие как CAPS, или буферы со сниженным pH, например, растворы уксусной кислоты.

Время уравнивания

В ранний период разработки методов блоттинга белков (конец 1970х - начало 1980х г.г.) большинством протоколов предписывалось уравнивание геля в течение 30 минут до начала блоттинга. Для стандартных размеров гелей со стороной 5 дюймов (12,7 см), или более, и минимальной толщиной > 1 мм требуется более длительное уравнивания, чтобы стабилизировать размер геля. По мере распространения мини-гелей, время уравнивания сократилось, т.к. они имеют меньший объем для уравнивания водой и метанолом.

Пространственное уравнивание стандартных мини-гелей достигается в течение 5-10 минут. Однако кинетика очистки от SDS происходит значительно медленнее, поэтому для большинства мини-гелей рекомендуется минимальное время уравнивания 15 минут.

Примечание: Для образцов, содержащих небольшие пептиды, быстрая миграция пептидов может происходить в отсутствие электрической силы. В этом случае уравнивание геля в буфере для переноса должно быть менее десяти минут.

В системах SDS-PAGE (метод электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле) в рабочий буфер добавляют SDS. SDS концентрируется в камере у катода и проходит в гель вслед за отслеживающим красителем («свидетелем») бромфеноловым синим. Поскольку большинство гелей работает до того как отслеживающий краситель достигает дна геля, весь избыток SDS остается в геле и переносится в процедуру блоттинга. Если SDS не диффундирует из геля до начала переноса, он будет препятствовать адсорбции белка. Время уравнивания можно увеличить до 30 минут, и необходимо использовать достаточное количество буфера, чтобы разбавить SDS до минимального уровня.

Влияние времени уравнивания на электроперенос BSA показано на Рисунке 9. В этом исследовании BSA с радиоактивными метками разложили методом SDS-PAGE, а затем гели уравнивали в буфере для переноса в течение разных интервалов времени, от нуля до 30 минут. Затем белки переносили на мембрану для переноса Immobilon®-P, за которой помещали мембрану для переноса Immobilon®-P^{SQ}

для того, чтобы адсорбировать все остатки BSA, прошедшие через мембрану для переноса Immobilon®-P. По завершении периода переноса количественно измеряли BSA в геле, на первичном блоте (Immobilon® -P) и на дублирующем блоте (Immobilon®- P^{SQ}). Показатель удерживания улучшился до 90%, когда длительность периода уравнивания увеличили до 30 минут. Выяснено, что другие белки ведут себя аналогично.

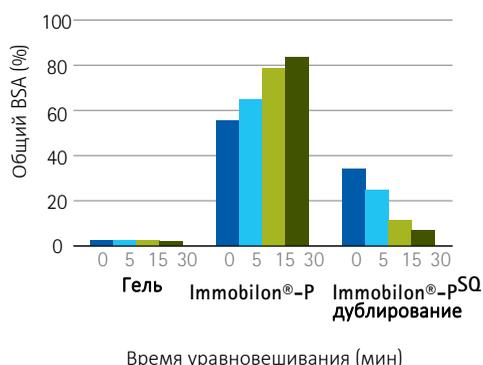


Рисунок 9.

Эффект времени уравнивания на электроперенос BSA на мембране Immobilon®-P .

BSA меченый ¹²⁵I проводили через SDS-PAGE в 10- 20% градиентном геле. После уравнивания в указанного времени BSA перенесли на мембрану Immobilon®-P и дублировали мембраной Immobilon®-P^{SQ} в камере переноса, в качестве буфера для переноса использовали 25 мМ Трис, 192 мМ глицина и 10 % метанола. Система запускали при 8 В/ см межэлектродном расстоянии. Через 2 часа после начала переноса гель и мембраны окрашивали. Вырезали полосы BSA и делали подсчет.

Разработка нового протокола переноса

Хотя в предыдущем разделе говорилось о том, что выбор буферов и условий переноса может быть очень сложным, система переноса в камере, сформулированная Таубином и соавторами (Towbin et al., 1979), а также полусухая система переноса Kyhse-Anderson (1984) хорошо работают для большинства образцов белка. Обе представляют отличные отправные точки. Если они оказываются неоптимальными для конкретного белка, условия переноса могут быть адаптированы к биохимическим особенностям белка. Интересная стратегия оптимизации для эффективного переноса белков в диапазоне молекулярной массы от 8000 до > 400 000 кДа была продемонстрирована Оттером и соавт. (Otter et al., 1987). В буфер для переноса добавляли 0,01 % SDS для поддержания растворимости высокомолекулярных белков и 20% метанола для повышения адсорбции. Электрическое поле применялось в два этапа. В течение первого часа переноса плотность тока была низкой, чтобы замедлить скорость миграции низкомолекулярных белков и увеличить время их пребывания в мембране. За этим следовал длительный период высокой плотности тока для элюирования высокомолекулярных белков.

При разработке нового протокола переноса или работе с новым типом образцов необходимо проводить окрашивание геля, чтобы убедиться, что все белки полностью элюировали из геля. Кроме того, настоятельно рекомендуется получать полосу для предварительно окрашенных маркеров в каждом геле, чтобы контролировать эффективность процесса переноса. Некоторые белки обладают ограниченной растворимостью в типичных буферах для переноса, что требует модификации химического состава буферов для предотвращения осаждения. Другие белки, такие как гистоны и рибосомальные белки, имеют положительный заряд в стандартных буферах для переноса и мигрируют к катоду. Эти белки могут быть успешно перенесены путем помещения листа мембраны Immobilon®-P на катодную сторону геля. Окрашивание мембраны после переноса может быть также полезно для того, чтобы убедиться, что белок-мишень присутствует на блоте. Для дополнительной информации о методах окрашивания, совместимых с последующей иммунодетекцией, см. ниже раздел «Визуализация белков».

Другой метод, позволяющий контролировать перенос белков - окрашивание гелей SDS-PAGE перед проведением электроблоттинга (Thompson и Larson, 1992). В этом методе гель окрашивали кумасси (Coomassie® Brilliant Blue) в ходе электрофореза или по его завершению. Перенесенные белки остаются окрашенными во время иммунодетекции и предоставляют набор фоновых маркеров для локализации и определения размера белка (Thompson и Larson, 1992).

Подготовка мембраны для идентификации белков

Для окрашивания и иммунодетекции

PVDF мембраны необходимо промыть деионизированной водой, чтобы удалить остатки геля. Затем блот инкубируют с блокирующим раствором.

Для экспресс-иммунодетекции и визуализация методом трансиллюминации

После завершения переноса, PVDF-мембраны должны быть полностью высушены, прежде чем перейти к окрашиванию или процедурам иммунодетекции. Сушка улучшает адсорбцию белков в PVDF-полимере и помогает минимизировать десорбцию при последующих анализах. Когда блоттированная мембрана высыхает, она становится непрозрачной. Такое оптическое изменение представляет собой внешнее явление, которое может маскировать удержание воды в глубине пор. Мембрана должна быть высушена в течение рекомендованного периода времени, чтобы гарантировать полное выпаривание жидкости из пористой структуры мембраны (см. Протокол 1.7. Методы сушки мембран, стр. 44).

Хранение

PVDF-мембраны могут храниться в сухом виде в течение длительного периода времени после переноса белков без нежелательных последствий для мембраны или белка (до двух недель при температуре 4 °C, до двух месяцев при температуре -20 °C, и в течение более длительных периодов при -70 °C). Однако некоторые белки могут быть чувствительны к химическим изменениям (например,

окислению, дезамидированию, гидролизу) при длительном хранении в неконтролируемых условиях среды. Рекомендуется длительное хранение при низких температурах. Перед дальнейшим анализом просушенные мембраны необходимо увлажнять путем смачивания в 100% метаноле.

Визуализация белков

Трансиллюминация

Трансиллюминация (Рис. 10, стр. 24) представляет собой уникальный для PVDF-мембран метод визуализации и впервые был описан для мембраны переноса Immobilon®-P (Reig и Klein, 1988). Этот метод использует характерную особенность мембраны PVDF: участки PVDF, покрытые перенесенными белками способны смачиваться 20% метанолом, тогда как прилегающие к ним участки PVDF не обладают этим свойством. Смачиваемые участки PVDF становятся оптически прозрачными, обеспечивая визуализацию белковых полос с использованием подсветки и фотоархивирования. Процесс является полностью обратимым при эвапорации. Дальнейшая денатурация белков практически невозможна, поскольку белки были ранее подвергнуты воздействию метанола в ходе блоттинга. Хотя этот метод и не позволяет визуализировать малораспространенные белки, он может быть использован для оценки общей эффективности переноса и пригодности блота для дальнейшего анализа.

Окрашивание

Окрашивание (Рис. 10) представляет собой простой метод, позволяющий сделать белки видимыми на блоте. Окрашивание может быть использовано для следующих целей:

- Подтвердить факт переноса белков на мембрану.
- Определить, что полосы были загружены равномерно.
- Оценить общую эффективность переноса, особенно в случаях новой буферной системы или белка.
- Определить и вырезать полосы для секвенирования пептидов.

Существует много типов окрашивания, включая органические красители (Понсо красный – Ponceau-S red, амидо-черный, быстрый зеленый и кумасси синий Coomassie® Blue), флуоресцентные красители (флуоресцеин, кумарин), а также коллоидные частицы (золото, серебро, медь, железо и тушь) (Kurien с соавт., 2003). В таблице 5 приведены наиболее распространенные красители для определения общего белка на вестерн-блотах. Красители разделены на две группы, дающие обратимое и необратимое окрашивание.

Обратимое окрашивание

Обратимое окрашивание позволяет сделать оценку блота, а затем его можно смыть с мембраны. Такое окрашивание не препятствует последующей иммунодетекции или другому анализу белков на блоте. Наиболее часто используемый обратимый краситель белка – Ponceau-S red

Основным недостатком обратимого окрашивания является то, что оно менее чувствительно, чем необратимое окрашивание. Поскольку картина окрашивания наиболее широко распространенных белков на блоте обычно является хорошим показателем переноса малораспространенных белков, этот недостаток в большинстве случаев можно считать незначительным.

Флуоресцентное окрашивание блотов высоко чувствительно и совместимо с последующей иммунодетекцией, секвенированием по методу Эдмана и масс-спектрометрией (Berggren с соавт., 1999). Такие красители блотов белка как Sypro® Ruby и Sypro® Rose (Life Technologies) обеспечивают чувствительность ок. 1-2 нг/полосу (Haugland, 2002) и могут быть использованы перед процедурами хромогенного, флуорогенного или хемилюминесцентного иммуноокрашивания.

Необратимое окрашивание

Необратимое окрашивание обычно имеет лучшую чувствительность, но может создавать помехи или препятствовать дальнейшему анализу белков. Примерами необратимого окрашивания являются окрашивание амидо-черным и Coomassie® Brilliant Blue

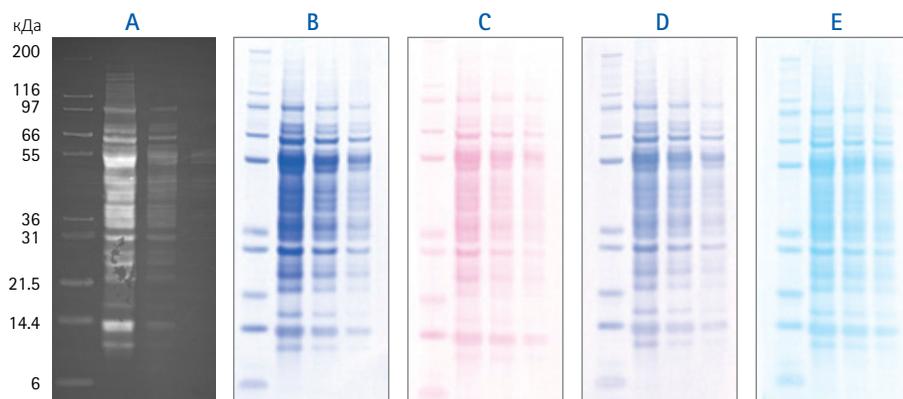


Рисунок 10 .

Белки печени теленка визуализировали после электроблоттинга на мембранах Immobilon®-P: (А) Трансиллюминация , (В) Coomassie® Brilliant Blue, (С) Ponceau-S red, (D) Амидо-чёрный и (Е) CPTS. Слева направо стандарты молекулярной массы и 12,2 мкг , 6,1 мкг , 3,1 мкг лизата на одну дорожку .

Таблица 5. Общепринятые красители, используемые в вестерн-блоттинге и их характеристики.

	Реактив обнаружения (протеин на спот)	Средняя чувствительность	Ссылка
Обратимое	Ponceau-S red	5 мкг	Dunn et al., 1999
	Fast green FC	5 мкг	Dunn et al., 1999
	CPTS	1 мкг	Bickar et al., 1992
	Sypro® Ruby	1–2 мкг	Haugland, 2002
	Sypro® Rose	1–2 мкг	Haugland, 2002
Необратимое	Амидо чёрный 10B	1 мкг	Dunn et al., 1999
	Coomassie® Brilliant Blue R-250	500 мкг	Dunn et al., 1999
	Тушь	100 нг	Dunn et al., 1999
	Коллоидное золото	4 нг	Dunn et al., 1999

Иммунодетекция

В иммунологическом анализе, или иммунодетекции, для обнаружения и локализации белка, переносимого на мембрану, используются специфичные антитела (Рис. 11). Специфичность связывания антиген-антитело позволяет идентифицировать один конкретный белок из комплексного образца

При разработке новых протоколов иммунодетекции должны учитываться все компоненты и их взаимодействия. Концентрация антител, буферные смеси, блокирующие агенты и временные параметры инкубации должны быть проверены эмпирически, чтобы определить лучшие условия. На всех этапах важно качество воды – небольшие примеси могут вызвать большие проблемы. Например, активность фермента пероксидазы хрена ингибируется пирогенами, распространенным типом загрязнителей, которые встречаются даже в высокоочищенной воде и азидом, обычным консервантом растворов антител. Необходимо также принимать во внимание качество блокирующих агентов со позиций однородности и загрязнений.

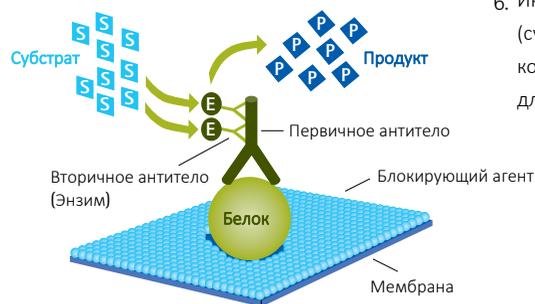


Рисунок 11.

Мембранная иммунодетекция.

Сравнение процедур стандартных и экспресс-методов иммунодетекции

Существует два типа протоколов иммунодетекции: стандартные и быстрые.

Стандартные методы иммунодетекции включают следующие этапы:

1. Блокирование незанятых участков мембраны для предотвращения неспецифического связывания антител.
2. Инкубация мембраны с первичными антителами, которые связываются с исследуемым белком.
3. Промывка для удаления всех несвязанных первичных антител.
4. Инкубация мембраны с конъюгированными вторичными антителами, которые связываются с первым антителом.
5. Промывка для удаления всех несвязанных вторичных антител.
6. Инкубация мембраны с подложкой (субстратом), который реагирует с конъюгированными вторичными антителами для обнаружения расположения белка.

Быстрая иммунодетекция исключает этап блокирования и сокращает время, затрачиваемое на промывку и инкубацию. Экспресс-метод иммунодетекции хорошо работает для быстрой визуализации широко распространенных белков. В отличие от него, стандартная иммунодетекция обеспечивает более высокую чувствительность и менее требовательна к оптимизации для новых типов образцов. Процедуры стандартных и экспресс-методов иммунодетекции изложены в Протоколе 3 (стр. 48-54) . В Таблице 6 дается сравнение временных затрат на выполнение этих двух протоколов.

Факторы, оказывающие влияние на иммунодетекцию

Понимание концепций, представленных в следующих разделах на иммунодетекции поможет в оптимизации протоколов для конкретных образцов.

Буферы

Наиболее часто используются два буфера: фосфатно-солевой буфер (PBS) и трис-буферный солевой раствор (TBS). Опубликованы многочисленные модификации

остава этих буферов. Основное требование к буферу состоит в том, что он должен способствовать сохранению биологической активности антител. Таким образом, ионная сила и pH должен быть достаточно близки физиологическим условиям. Формула PBS с 10 mM концентрации общих фосфатов хорошо работает с широким спектром антител и субстратов для обнаружения.

Во время инкубации контейнер, содержащий мембрану, необходимо осторожно перемешивать (встряхивать). Следует использовать достаточный объем буфера, чтобы он полностью покрывал мембрану, и она свободно плавала в буфере. Если в контейнер помещают более одного блота, недостаточный объем буфера приведет к склеиванию блотов между собой. Это ограничит доступ к инкубационным растворам и может привести к появлению ряда артефактов, включая высокий фон (шум), слабый сигнал и неравномерную чувствительность.

Таблица 6. Сравнение стандартных и экспресс-методов иммунодетекции.

Шаг	Стандартная иммунодетекция	Быстрая иммунодетекция
1. Блокирование мембраны	1 час	Нет
2. Инкубация с первичн. антителами	1 час	1 час
3. Промывка мембраны	3 x 10 мин	3 x 5 мин
4. Инкубация с вторичн. антителами	1 час	30 мин
5. Промывка мембраны	3 x 10 мин	3 x 5 мин
6. Добавление субстрата	5 мин	5 мин
Общее время	4 часа 5 мин	2 часа 5 мин

Блокирование

Для получения значимых результатов антитела должны связываться только с исследуемым белком, но не с мембраной. Неспецифичное связывание (NSB) антител может быть уменьшено путем блокирования незанятых участков мембраны инертным белком, неионным детергентом или небелковым блокатором, таким как реагент шумоподавления Bløx®. Блокирующий агент должен иметь большую аффинность к мембране, чем антитела. Он должен заполнить все незанятые участки связывания на мембране без вытеснения из мембраны белка-мишени. К наиболее распространенным блокирующим агентам относятся бычий сывороточный альбумин (BSA, 0,2-5,0 %) , обезжиренное молоко, казеин, желатин, разбавленные растворы детергента Tween®-20 (0,05-0,1 %) и реагенты Bløx®. Было также показано, что детергент Tween®-20 влияет на ренатурацию антигенов, что приводит к улучшению распознавания специфичных антител (Van Dam и соавт.,1990; Zampieri и соавт., 2000) . Иногда используются и другие детергенты, такие как Triton® X-100, SDS и NP-40 , но они могут действовать слишком жестко и нарушить взаимодействие между белками. Блокирующий агент обычно растворяют в PBS или TBS буферах.

Существуют риски, связанные с блокировкой: плохо подобранный блокирующий агент или чрезмерное блокирование, что может вытеснить или замаскировать исследуемый белок. Поэтому правильный выбор блокирующего агента может иметь решающее значение для успешной иммунодетекции. Например, сухое молоко нельзя использовать с биотинилированными или мечеными конканавалином антителами, так как молоко содержит и гликопротеины и биотин. Анализ фосфорилированных белков фосфор-специфичными антителами может быть нарушен, если в качестве блокирующего агента используется неочищенный препарат белка. Такие препараты могут содержать фосфатазы, и фосфорилированные белки на блоте могут быть дефосфорилированы этими ферментами. Показано, что добавление ингибиторов фосфатазы в блокирующий раствор усиливает сигнал от фосфор-специфичных антител (Sharma

и Carew, 2002). Наконец, блокирующий агент, пригодный для одного сочетания антиген-антитело, может не подходить для другого.

Совместимость между блокирующим агентом и реагентом для обнаружения можно легко определить с помощью метода спот-блоттинга (Spot Blotting Method), описанного в Протоколе 1.5 (стр. 41). Блокирующий раствор наносят на пустую PVDF мембрану, предварительно увлажненную метанолом и уравновешенную в TBS. Затем к блоту добавляют реагенты для обнаружения, инкубируют блот в течение 5 минут, а затем экспонируют на рентгеновской пленке. Появление темным пятном указывает на то, что блокирующий реагент несовместим с реагентом для детекции (Рис. 19 , стр. 42). Важно помнить, что мембрана для переноса Immobilon®-P^{sq} имеет большую площадь поверхности, меньший размер пор и связывает больше белка, по сравнению с мембраной для переноса Immobilon®-P. Если в стандартной процедуре вестерн-блоттинга мембрану Immobilon®-P^{sq} напрямую заменить на мембрану Immobilon®-P, то блокирующего реагента может оказаться недостаточно для насыщения поверхности мембраны. Для уменьшения фона могут также потребоваться дополнительные промывки. Блокирование может быть удобно оптимизировано с использованием метода спот-блоттинга (стр. 40).

Антитела

После блокирования блот инкубируют с одним или несколькими антителами. Первое антитело связывается с белком-мишенью, а вторичное антитело связывается с первым. Вторичное антитело конъюгируют с ферментом или красителем, который используется, чтобы указать местоположение белка.

Хотя первичное антитело может быть помечено непосредственно, введение вторичного антитела имеет определенные преимущества. Во-первых, с одной молекулой первичного антитела может связываться несколько (более одной) молекул вторичного антитела, что приводит к усилению сигнала. Во-вторых, меченое вторичное антитело

(конъюгат фермент-антитело) может быть использовано для большого количества первичных антител разной специфичности, тем самым устраняя необходимость мечения множества первичных антител.

Используются как поликлональные, так и моноклональные первичные антитела. Поликлональные антитела обычно выступают в виде антисыворотки или аффинно-очищенных антител. Моноклональные антитела могут быть выражены в виде полостной жидкости или жидкой культуры ткани и могут быть использованы как непосредственно, так и в виде аффинно-очищенного препарата. Важно помнить, что денатурированный белок не может распознаваться антителом нативного антигена. В некоторых случаях может потребоваться неденатурирующий гель для получения блота. Антитела разводят в буфере и в блокирующем растворе для предотвращения неспецифического связывания с мембраной. Разбавитель антитела обычно также содержит следы Tween®-20 или другого детергента для предотвращения неспецифической агрегации антител. Многие опубликованные протоколы по хемилюминесценции включают 0,1% (по объему) Tween®-20 в блокирующем растворе и разбавитель антител. Важно понимать, что концентрации свыше 0,05% (по объему) имеют достаточный потенциал для вымывания из мембраны некоторых блоттированных белков.

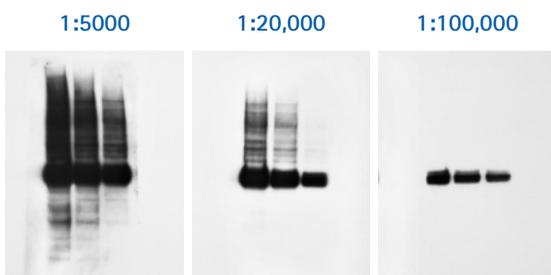


Рисунок 12.

Оптимизация разведения растворов вторичных антител для иммунодетекции ERK 1 на субстрате Immobilon® Western Chemiluminescent HRP. Для каждого геля применяли двукратное разведение образцов лизата печени крысы. Белки после электроблоттинга тестировали кроличьим анти-ERK 1 антителом (разведение 1:1000) и конъюгированным с HRP коза-антикролик IgG (разведение 1:5000, 1:20000 и 1:100000, слева направо).

Повышение концентрации детергента Tween® -20 зачастую снижает уровень фона. Часто более простой и экономически эффективной стратегией является снижение концентрации антител, особенно вторичных антител (см. Рис. 12). В дополнение к свойству специфичности для изучаемого белка, антитела не должны вступать в перекрестную реакцию с компонентами блокирующего буфера и должны быть сравнительно чистыми. Примеси в виде других белков или агрегатов могут вызвать неспецифическое связывание и усилить фон.

Иммунодетекция представляет чрезвычайно чувствительный метод. Чтобы достичь высокого отношения сигнал-шум и, таким образом, максимальной чувствительности, концентрации первичных и вторичных антител необходимо оптимизировать для каждого случая. Как правило, неспецифический сигнал может быть уменьшен за счет более высокого разбавления первичных антител или уменьшением нагрузки белка на исходный гель. Высокий общий фон может быть уменьшен более высоким разбавлением конъюгированных с ферментом вторичных антител.

Оптимальные концентрации первичных и вторичных антител также зависят от чувствительности реагентов для обнаружения. Для высокочувствительных реагентов (обнаружение на уровне фемтограмма) требуется до двадцати раз меньше антител по сравнению с низкочувствительными реагентами (обнаружение на уровне пикограмма). Пример оптимизации концентрации антител в зависимости от субстрата обнаружения показан на Рис. 13. При использовании наиболее чувствительных реагентов для обнаружения (реагент Luminata Forte™), избыточное количество антител привело к высокому неспецифическому и в целом повышенному общему фону (верхний слева). В этом случае увеличение разбавления первичных антител от 1:1000 до 1:10000 улучшило соотношение сигнал-шум. При последовательном снижении чувствительности реагентов для обнаружения (средний и нижний ряды, соответственно) и для получения сигнала той же силы необходимо повышать концентрацию антител.

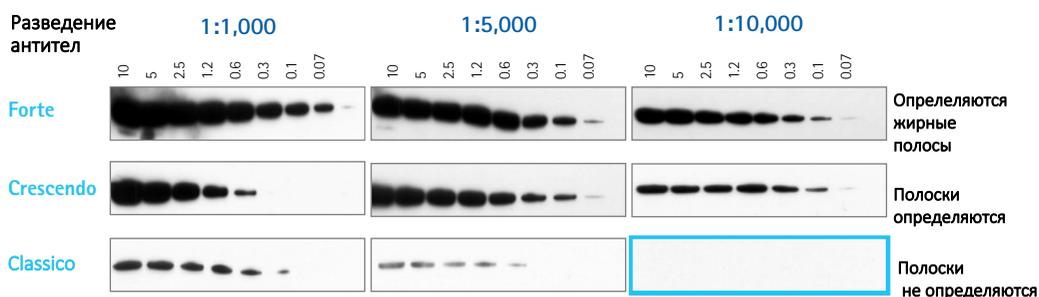


Рисунок 13.

Чем более чувствителен реагент для обнаружения, тем меньше необходимо антител.

Иммуноблоты, содержащие указанные количества лизатов A431, были исследованы с различными концентрациями анти-GAPDH антител (Кат.№ MAB374), указанными в верхней строке, а затем с соответствующим вторичным антителом. Полосы визуализировали с использованием указанного субстрата Luminata™ HRP и экспонировали на рентгеновской пленке в течение 5 минут. Из трех реагентов для обнаружения, Luminata™ Forte является наиболее чувствительным, следует за ним – Luminata™ Crescendo, а затем Luminata™ Classico

Применение субстратов HRP (пероксидазы хрена) с более высокой чувствительностью дает преимущества в трех направлениях::

- 1. Лучшие результаты:** более сильные полосы для лучшей количественной характеристики блота (ср. увеличение интенсивности полос для субстратов Luminata Crescendo™ & Forte при разведении 1:10000)
- 2. Быстрее:** нужно всего 10 минут, чтобы промыть блот и добавить новый субстрат по сравнению с 2,5 часами, необходимыми для повторной инкубации антител.
- 3. Дешевле:** субстраты HRP стоят намного дешевле, чем цена антител.

Промывка

Промывкой блота достигается удаление всех несвязанных антител из мембраны, которые могут вызвать высокий фон и низкое качество обнаружения. Обычно используют разбавленный раствор Tween®-20 (0,05% по объему) в буфере PBS или TBS, особенно, когда препараты антител сравнительно плохо очищены или используются при высоких концентрациях. Как упоминалось ранее, концентрированные растворы детергентов могут привести к нежелательной элюции исследуемого белка из мембраны. Для высокоочищенных антител, для промывки зачастую достаточно одного буфера.

Количество требуемых промывок лучше всего определять экспериментально. Недостаточная промывка приведет к избыточному фону, в то время как избыточная промывка может вызвать элюцию антител и уменьшить сигнал. Рекомендуется делать минимум три промывки, каждую в течение 5 минут.

Стойкий фон можно уменьшить добавлением к промывочному буферу TBS хлорида натрия до 0,5 М и до 0,2 % SDS, а также увеличением времени промывки до 2 часов.

Double Blotting

Инновационный метод устранения неспецифического связывания в вестерн-блотах был разработан Dr. Françoise Lasne, Laboratoire National de Dépistage du Dopage (Национальная антидопинговая лаборатория, Франция), Châtenay-Malabry, France (Lasne, 2001; Lasne, 2003). При исследовании рекомбинантного человеческого эритропоэтина (EPO) было обнаружено, что рекомбинантные и естественные EPO имеют разные изоэлектрические точки (pI). Рекомбинантный EPO имеет pI 4,42-5,11, в то время как природный EPO имеет более кислый pI =3.92-4.42. Однако, при блоттинге образцов мочи

очень высокое неспецифическое связывание (NSB) вторичных антител затрудняет разделение между рекомбинантным и природным ЕРО. Для устранения NSB, Dr. Lasne использовала «двойной блоттинг». После того, как первичное антитело связывается с блоттируемым белком, антитела переносятся на вторую мембрану Immobilon®-P в кислой среде. Первичные антитела десорбируются из соответствующего антигена и переносятся через промежуточную на вторую (двойной блот) мембрану. При двойном блоте мембрану зондируют с вторичным антителом, при этом полностью отсутствуют белки, способные к неспецифическому связыванию и, тем самым, исключается проблема фона (см. Протокол 1.6. Процедура двойного блоттинга, стр. 43).

«Двойной блоттинг» также используется для обнаружения транстиретина и является полезным методом для обнаружения других белков низкой концентрации в сыворотке или моче.

Субстраты для детекции

Современные методы иммунодетекции основаны на обнаружении ферментных соединений, с использованием вторичных антител, ковалентно связанных с такими ферментами, как пероксидаза хрена (HRP) или щелочная фосфатаза (AP). Конъюгированный фермент катализирует разложение специфических субстратов, в результате чего генерируется сигнал. Обычно используют три типа субстратов: хромогенные, хемилюминесцентные и хемифлуоресцентные, а также обнаружение с помощью флуороформеченых вторичных антител. Мембраны Immobilon® PVDF были протестированы на совместимость со всеми имеющимися на рынке хромогенными и хемилюминесцентными субстратами.

Хромогенная детекция

В хромогенной детекции (Рис. 14) используют конъюгированные ферменты для катализа реакции, в результате которой происходит осаждение нерастворимого окрашенного осадка; например, в результате взаимодействия 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата (BCIP) и соли нитросинего тетразолия (NBT) образуется

нерастворимое соединение голубого цвета (Leary, и соавт., 1983). Этот метод прост в исполнении и не требует никакого специального оборудования для анализа. Однако необходимо иметь в виду следующее:

- Чувствительность хромогенной детекции обычно, как минимум, на порядок ниже, чем при использовании хемилюминесцентных реагентов.
- Осаждение может препятствовать активности фермента и ограничивать чувствительность
- Осадок трудно удалить от мембраны, что ограничивает возможность повторного использования блота для обнаружения других белков.



Рисунок 14.

Рисунок 14. Иммунодетекция трансферрина в сыворотке крови человека с хромогенными субстратами BCIP/NBT (KPL). Слева направо, 5 μ L сыворотки крови человека в разведении 1:1000, 1:5000, 1:25000, 1:125,000. Белки после электроблоттинга исследовали с козьими антителами к человеческому трансферрину (разведение 1:10000) и конъюгированным с AP кролик-антикоза IgG (разведение 1:30000).

Хемилюминесцентная детекция

В хемилюминесцентной детекции используют конъюгированные ферменты для катализа реакции, приводящей к образованию видимого света. Некоторые хемилюминесцентные системы основаны на образовании перекисей пероксидазой хрена; другие системы используют субстраты 1,2-диоксетана и ферменты щелочную фосфатазу (Cortese, 2002). Этот метод имеет такую же скорость и надежность как и метод хромогенной детекции при уровнях чувствительности, сравнимых с радиоизотопной детекцией. Обнаружение достигается либо путем экспозиции блота на рентгеновскую пленку, либо получением изображения непосредственно в ХЛ-совместимые цифровые системы визуализации, как правило, оснащенные высокопроизводительными камерами охлаждения CCD, позволяющими исключить электромагнитные помехи. При использовании хемилюминесцентных субстратов возможно проведение повторного исследования.

Существуют разнообразные хемилюминесцентные субстраты для разных уровней чувствительности обнаружения. Классические субстраты низкой чувствительности позволяют обнаруживать белки на уровне пикограмма. Хотя эти субстраты подходят для рутинных применений, они не могут обнаруживать малораспространенные белки. Новые высокочувствительные субстраты, такие как Luminata™ HRP, обеспечивают визуализацию белков на уровне фемтограмма. Однако использование этих мощных субстратов зачастую требует оптимизации концентраций первичных и вторичных антител (Рис. 13, стр. 29). При переходе от субстрата с низкой чувствительностью к высоко чувствительному, как, например, Luminata™ Forte, рекомендуется увеличить разведение антител, чтобы избежать чрезмерного фона и появления неспецифических полос.

Реагенты для ECL-иммунодетекции можно приготовить, используя р-йодфенол (PIP) и люминол (Hengen, 1997). Для усиления реакции видимого света PIP необходим как кофактор активности пероксидазы к люминолу. Когда фенольные усилители используются в сочетании с HRP, световой уровень усиливается примерно в 100 раз (Van Dyke и Van Dyke, 1990). Упомянуется, что такие «самодельные» реагенты дают превосходные результаты, однако, высокая чистота люминола и PIP является критичной (Hengen, 1997).

Флуоресцентная детекция

В флуоресцентной детекции используют конъюгированные с флуорофором антитела и флуорогенные субстраты, которые флуоресцируют в месте активности фермента (хемифлуоресценция). Одним из преимуществ этого метода является то, что флуоресцентный сигнал сохраняет стабильность в течение длительного периода времени, а блоты можно хранить и повторно делать снимки. Кроме того, большое разнообразие флуорофоров позволяет одновременно обнаруживать несколько белков-мишеней в одном образце (мультиплексное обнаружение). До недавнего времени применение флуоресцентной детекции в вестерн-блоттинге было ограничено

вследствие высокого флуоресцентного фона у большинства мембран для блоттинга. По сравнению с другими мембранами для блоттинга, мембрана для переноса Immobilon®-FL обладает низкой фоновой флуоресценцией в широком диапазоне возбуждения/длин волн излучения (Рис. 15). Мембрана идеально подходит для любого приложения, включая иммунодетекцию на основе флуоресценции, в т.ч., хемифлуоресцентные субстраты и мультиплексирование (Рис. 16). Кроме того, мембрана Immobilon®-FL может быть использована для стандартной хемилюминесцентной или хромогенной детекции.

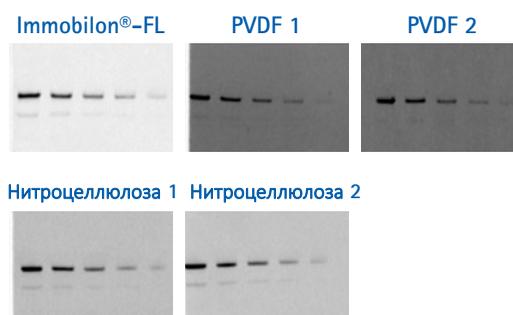


Рисунок 15.

Перевернутое изображение, демонстрирующее флуоресцентную детекцию трансферрина в сыворотке крови человека на различных мембранах для блоттинга. Разведения сыворотки: 1:4,000, 1:8,000, 1:16,000, 1:32,000 и 1:64,000.

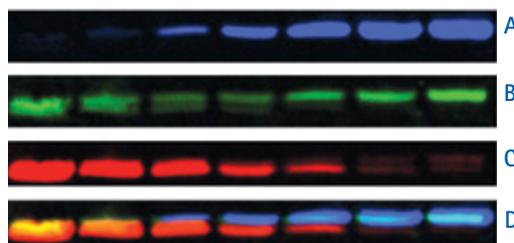


Рисунок 16.

Вестерн-блоты из серийных разведений клеточного лизата *E. coli*, со сверхэкспрессией белка GST метками cMyc или HA. (A) метка cMyc обнаружена с первичным антителом, с последующим Qdot® 705 (псевдо-синего цвета) конъюгатом анти-мышь, (B) GST обнаружен с Qdot 565 (зеленый) конъюгатом анти- GST, (C) метка HA обнаружена с первичным антителом, с последующим Qdot® 605 (красный) конъюгатом анти-мышь, (D) блот исследован с сочетанием всех трех антител (мультиплексирование). Блоты были отсканированы на Kodak Imager. Данные представлены компанией Quantum Dot Corporation

Повторное исследование с использованием мембран для переноса Immobilon® PVDF

Отдельный блот может быть последовательно проанализирован с несколькими антителами путем удаления с блота первого антитела и инкубации с другим. Это особенно полезно для совместной локализации экспериментов и оптимизации методов, или в случае ограниченного количества образца (см. Протокол 5.4 Протоколы очистки мембран, стр. 55).

Процесс стриппирования разрушает связи антиген-антитело и растворяет антитела в окружающем буфере. Обычно это происходит либо при совместном действии детергента и нагревания или под воздействием низких pH. Ни один из методов не может удалить окрашенный осадок, полученный в системах хромогенной детекции (например, BCIP, 4CN, DAB и TMB). Тем не менее, возможно проанализировать блот с использованием антитела, специфичного для другого белка-мишени.

Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия с использованием мембран для переноса Immobilon® PVDF

Масс-спектрометрия (MS) представляет собой аналитический метод для идентификации белков на блоте. После окрашивания белков на PVDF-мембране MS-совместимым красителем (кумасси – Coomassie® Blue, амидо-черный или Sypro®), исследуемую полосу вырезают из мембраны и подвергают трипсиновому пищеварению. Затем полученные фрагменты пептидов анализировали с помощью масс-спектрометрии (Gharahdaghi и соавт., 1996; Bienvenut и соавт., 1999; Bunai и соавт., 2003). На Рис. 17 показан MALDI-TOF -спектр, полученный разложением бычьего белка на мембране и успешно идентифицированного как каталаза.

Другой метод, заслуживающий внимания, - протеин-масс-спектрометрия непосредственно из блоттированной мембраны для переноса Immobilon® PVDF. Этот метод обычно применяют для разделенных белков в 2-D геле. Используя параллельный процесс, все белки в геле одновременно подвергают протеолизу и переносят (электроперенос) на мембрану Immobilon®

PVDF, которую затем проверяют на наличие пептидов (Binz и соавт., 1999; Bienvenut и соавт., 1999; Bienvenut и соавт., 2003). Кроме того, согласно методу, называемому «химический принтинг» (Wallace и соавт., 2001 ; Gooley и соавт., 1998), после двумерного разделения белков их сначала перенесли на PVDF-мембрану и визуализировали, а затем подвергли перевариванию нанесением незначительного количества трипсина непосредственно на блоты (Sloane и соавт., 2002). В обоих способах мембраны опрыскивали матрицей и сканировали напрямую MALDI-TOF MS. Идентификацию белков проводили методом пептидного фингерпринта. На Рис.18 показано 2-D- разделение белков плазмы человека с передачей на мембрану Immobilon®- P^{SQ} и два спектра MALDI-TOF, полученные для идентификации белков, иммобилизованных на мембране.

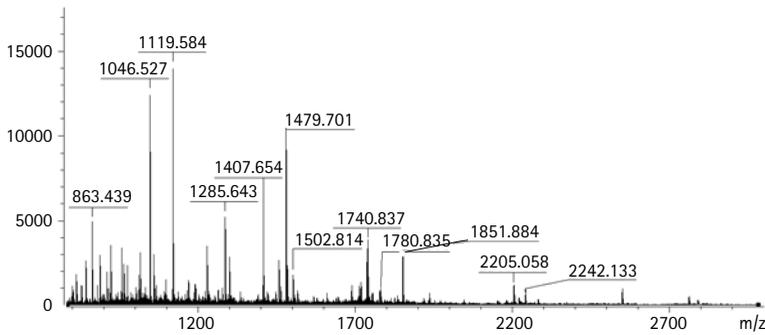


Рисунок 17.

MALDI-TOF спектр полосы блота белков печени, окрашивание Coomassie® Blue по Протоколу 5.1. Расщепление белка на мембране, стр. 57 (Bienvenut и соавт., 1999). Белок идентифицирован как бычья каталаза, балл по MOWSE - 6.4, 34 % покрытие. Данные получены на масс-спектрометре Bruker® Autoflex™. Поиск проводили с использованием Protein Prospector.

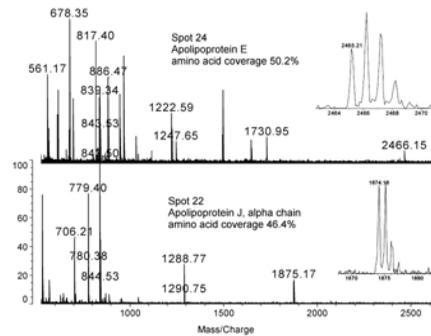
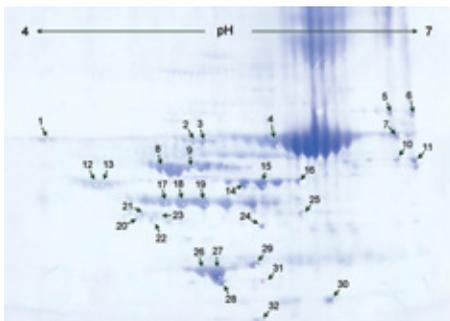


Рисунок 18.

Человеческая плазма после разделения в 2-D электрофорезе перенесена на мембраны Immobilon®-PSQ (слева) и масс-спектры MALDI-TOF (справа), полученные с поверхности мембраны после трипсинового расщепления белков. Человеческую плазму разделяли 2D-электрофорезом, переносили электро-блоттингом на мембраны Immobilon®-PSQ и приклеивали к мишени MALDI. Переваривание белков трипсином эндопротеиназы проводили на поверхности мембраны. Необходимое количество фермента (нанолитры) распыляли капельно-струйным пьезоэлектрическим устройством на поверхность мембраны с помощью инструмента Chip™ (Proteome Systems и Shimadzu Corp.). Полученные пептиды анализировали на AXIMA™-CFR (Shimadzu Corp.) MALDI-TOF MS и идентифицировали методом фингерпринта пептидной массы. Эти пептиды анализировали непосредственно с поверхности мембраны, матрицу MALDI микродиспергировали на расщепленные белки перед анализом. Данные любезно предоставлены Drs. J.L. Duff, F.G. Hopwood, C.J. Hill, A.A. Gooley (Proteome Systems, Ltd., Sydney, Australia).

Протоколы

Данный раздел руководства представляет сборник наиболее часто используемых протоколов блоттинга белков. Методы являются достаточно общими того, чтобы использовать их со всеми имеющимися на рынке реагентами для обнаружения. Они могут быть оптимизированы с помощью многочисленных практических советов, которые также включены в этот раздел. Эти советы по оптимизации являются объединенным продуктом многолетнего опыта компании Merck Millipore в области мембран переноса и блоттинга, а также использованной литературы и отзывов наших клиентов.

► **Совет:** в буфере для переноса этанол или изопропанол можно заменить на метанол.

► **Совет:** SDS в буфере для переноса (до 0,05 %) может улучшить эффективность переноса, но также может снизить удерживание белка мембраной.

► **Совет:** нарезанные листы мембран для переноса Immobilon® подходят по размеру ко всем стандартным мини-гелям и обычным системам электрофореза. (Таблицы на стр. 8 и 9).

Рекомендация – охлаждайте буфер для переноса перед работой в камере.

► **Совет:** толстые гели или крупные белки могут потребовать больше времени для процесса переноса или повышенной напряженности поля. Фактические условия переноса белков должны быть оптимизированы для каждой системы.

► **Совет:** Метанол в буфере для переноса (8-20%) ухудшает эффективность элюции белка из геля, но улучшает адсорбцию на PVDF-мембрану.

► **Совет:** Вследствие гидрофобной природы PVDF, мембраны необходимо смачивать спиртом.

► **Совет:** Трис-глициновый буфер будет давать более высокий фон (шум) в N-концевом секвенировании. Используйте для переноса CAPS или TBE буфер, если белковые связи будут секвенированы деградацией по Эдману.

► **Совет:** При анализе низкомолекулярных белков замените мембрану для переноса 0,45 мкм Immobilon®P мембраной 0,2 мкм Immobilon®-P^{SQ}.

► **Совет:** Используйте мембраны для переноса 0,45 мкм Immobilon®-FL в люминесцентных методах детекции.

1. Перенос белков

Протокол 1.1

Электроперенос: Перенос в камере (влажный)

Следующий протокол описывает стандартную процедуру переноса белков из полиакриламидного геля (SDS-PAGE) на мембрану для переноса Immobilon®PVDF с использованием системы камеры пере-носа. Для дополнительной информации смотрите инструкцию, прилагаемую к вашей системе камеры переноса.

Необходимое оборудование и растворы

- Полиакриламидный гель, содержащий растворенные белки.
- Мембрана для переноса Immobilon® PVDF, нарезанная по размеру геля (включая срезанный угол для ориентации).
- Два листа фильтровальной бумаги Whatman® 3 мм или эквивалентной, нарезанные по размеру геля.
- Две пенопластовые прокладки (например, Scotch Brite® pads).
- Камера для переноса (фореза), достаточно большая для размещения геля.
- Метанол, 100%.
- Очищенная вода Milli-Q®.
- Трис-глициновый буфер переноса: 25 мМ Трис основания, 192 мМ глицина, 10% (по объему) метанол, pH 8,3; или CAPS буфер: 10 мМ 3 - [циклогексиламино]-1-пропансульфоновой кислоты (CAPS), 10% (по объему) метанол, pH 11 (корректировано с NaOH) .

Примечание: Оба буфера могут быть приготовлены заранее в виде стоковых растворов 10X и смешаны с метанолом непосредственно перед использованием.

Постановка

1. Подготовьте достаточное количество буфера для переноса, чтобы заполнить камеру, плюс дополнительные 200 мл, чтобы уравновесить гель и мембрану и смочить фильтровальную бумагу.
2. Удалите гель от кассеты; подравняйте края концентрирующего геля и вырезать лунки.
3. Погрузите гель в буфер для переноса на 10-30 минут.
4. Смочите фильтровальную бумагу в буфере для переноса в течение минимум для 30 секунд.
5. Подготовьте мембрану:
 - a. Намочите мембрану в метаноле в течение 15 секунд. Мембрана должна равномерно измениться, от непрозрачной до полупрозрачной.
 - b. Аккуратно положите мембрану в воду качества Milli-Q® и оставьте намокать на 2 минуты.
 - c. Аккуратно поместите мембрану в буфер для переноса и оставьте для уравнивания в течение не менее 5 минут.

Сборка вертикального пакета переноса белков

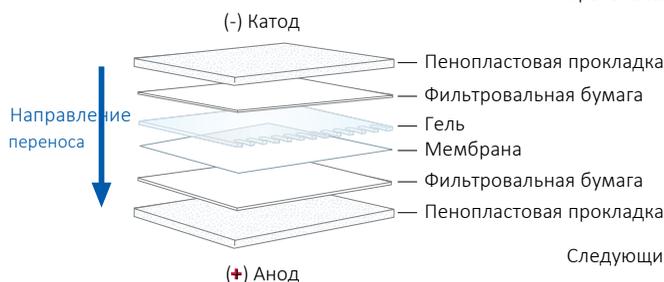
1. Откройте держатель кассеты.

Важно: Чтобы обеспечить равномерный перенос, удалите пузырьки воздуха между слоями, тщательно прокатав пипетку или палочку для перемешивания по поверхности каждого из слоя, входящего в вертикальный пакет (сэндвич). Избегайте чрезмерного давления, чтобы не допустить повреждения мембраны и геля.

2. Поместите пенопластовую (волоконную) прокладку с одной стороны кассеты.
3. Поместите один лист фильтровальной бумаги поверх прокладки.

- Поместите гель поверх фильтровальной бумаги.
- Поместите мембрану поверх геля.
- Поместите второй лист фильтровальной бумаги поверх пакета.
- Поместите вторую пенопластовую прокладку поверх фильтровальной бумаги.
- Закройте держатель кассеты.

Готовый пакет должен выглядеть следующим образом:



Протокол 1.2 Электроперенос: полусухой перенос

Протоколы визуализации белков – см. стр. 45;
протоколы иммунодетекции – см. стр. 48.

Перенос белка

- Поместите держатель кассеты в камеру переноса так, чтобы гелевая сторона была обращена к катоду (-), а мембранная сторона – к аноду (+).
- Добавьте в камеру достаточное количество буфера, чтобы покрыть держатель кассеты.
- Вставьте черный катодный вывод (-) в катодный штекер блока переноса, а красный анодный вывод (+) – в анодный штекер.
- Подключите анодный и катодный выводы к соответствующим разъемам на источнике тока.
- Если необходимо, установите блок охлаждения на камере переноса, в соответствии с инструкциями производителя.

Следующий протокол описывает стандартную процедуру переноса белков из полиакриламидного геля (SDS-PAGE) на мембрану для переноса Immobilon® PVDF с использованием полусухой системы переноса. Этот протокол специфичен для устройств полусухого переноса белков с анодной пластиной, которая служит основой. Для устройств с основой в виде катодной пластины информацию о рекомендуемых буферах и сборке пакета переноса белков смотрите в инструкции по эксплуатации. Данный протокол описывает трехбуферную систему. Также могут быть использованы однобуферные системы. Пожалуйста, обращайтесь к рекомендациям производителя.

TIP: Совет: Для полусухих систем переноса важно, чтобы размеры нарезанной фильтровальной бумаги и мембран соответствовали размеру геля, чтобы обеспечить прохождение тока через гель.

► **Совет:** В обоих типах систем переноса (в камере и полусухим методом) следует проявлять особую осторожность, чтобы предотвратить попадание пузырьков воздуха в любом месте между фильтровальной бумагой, гелем или мембраной.

► **Рекомендуется** - Перенос белков при постоянном токе. Если перенос проводится при постоянном напряжении, контролируйте силу тока, чтобы она не превышала 0,4 ампер. Начините со 100 В и уменьшите напряжение, если сила тока слишком высока.

► **Совет:** Обе стороны мембраны Immobilon® одинаково хорошо переносят белок. Внешний вид стороны мембраны (блестящий или матовый) не оказывает влияния на качество переноса и эффективность обнаружения.

► **Совет:** Для образцов, содержащих небольшие пептиды, время уравновешивания геля в буфере для переноса должно быть не более 10 минут.

Гели для переноса могут быть использованы индивидуально или же несколько гелей могут быть объединены в один пакет.

- Анодный буфер II: 25 мМ Трис, pH 10,4; 10% (по объему) метанол.
- Катодный буфер: 25 мМ Трис, 40 мМ 6-амино-п-капроновой кислоты (можно заменить глицином), 10% (по объему) метанол, pH 9,4.
- Метанол 100%.
- Вода качества Milli-Q®.

ля множественного переноса – все вышеперечисленное, плюс следующее:

- Диализная мембрана, нарезанная по размеру геля и смоченная водой Milli-Q®. (Мембрана должна иметь достаточно низкий порог эксклюзии по молекулярной массе, чтобы удерживать в геле самые низкомолекулярные белки).
- Дополнительные листы фильтровальной бумаги.

Постановка

1. Приготовьте по 200 мл каждого анодного буфера и 400 мл катодного буфера
2. Удалите гель от кассеты; подравняйте концентрирующий гель.
3. Погрузите гель в 200 мл катодного буфера на 15 минут.
4. Намочите два листа фильтровальной бумаги в анодном буфере I в течение минимум 30 секунд.
5. Намочите один лист фильтровальной бумаги в анодном буфере II в течение минимум 30 секунд.
6. Намочите три листа фильтровальной бумаги в катодном буфере в течение минимум 30 секунд.
7. Подготовьте мембрану:
 - a. Намочите мембрану в метаноле в течение 15 секунд. Мембрана должна равномерно измениться, от непрозрачной до полупрозрачной.
 - b. Аккуратно положите мембрану в воду Milli-Q® и оставьте намокать на 2 минуты.
 - c. Аккуратно поместите мембрану в анодный буфер II и оставьте для уравновешивания в течение не менее 5 минут.

Необходимое оборудование и растворы

Для единичного переноса:

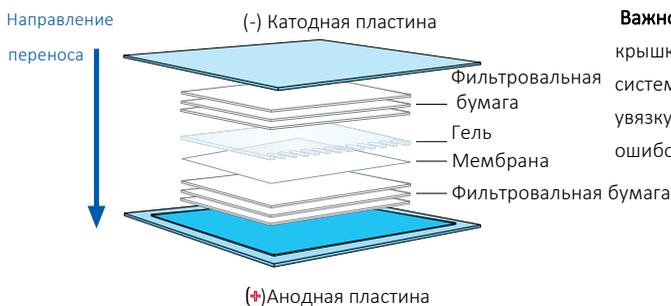
- Полиакриламидный гель, содержащий растворенные белки.
- Мембрана для переноса Immobilon® PVDF, нарезанная по размеру геля (включая срезанный угол для ориентации).
- Шесть листов фильтровальной бумаги Whatman® 3 мм или эквивалентной, нарезанные по размеру геля.
- Система для полусухого переноса, достаточно большая для размещения геля.
- Анодный буфер I: 0,3 М Трис, pH 10,4, 10% (по объему) метанол.

Сборка вертикального пакета переноса белков

При использовании системы для полусухого переноса смотрите инструкции по эксплуатации конкретного производителя. Важно: Чтобы обеспечить равномерный перенос, удалите пузырьки воздуха между слоями, тщательно прокатав пипетку или палочку для перемешивания по поверхности каждого из слоев, входящего в вертикальный пакет (сэндвич). Избегайте чрезмерного давления, чтобы не допустить повреждения мембраны и геля.

Для единичного переноса:

1. Поместите пластину анодного электрода на верхнюю часть уровневой поверхности.
2. Поместите два листа фильтровальной бумаги, пропитанной анодным буфером I, в центральную часть пластины планшета.
3. Поместите фильтровальную бумагу, пропитанную анодным буфером II, поверх первых двух листов.
4. Поместите мембрану поверх слоев фильтровальной бумаги.
5. Поместите гель поверх мембраны.
6. Поместите три листа фильтровальной бумаги, пропитанной катодным буфером, поверх мембраны.
7. Поместите пластину катодного электрода поверх собранного пакета.



Для множественного переноса:

1. Поместите пластину анодного электрода на верхнюю часть уровневой поверхности.
2. Поместите два листа фильтровальной бумаги, пропитанной анодным буфером I, в центральную часть пластины планшета.
3. Поместите фильтровальную бумагу, пропитанную анодным буфером II, поверх первых двух листов.
4. Поместите мембрану поверх слоев фильтровальной бумаги.
5. Поместите гель поверх мембраны. После последнего гелевого слоя перейдите к п.10.
6. Поместите лист фильтровальной бумаги, пропитанной катодным буфером, поверх геля.
7. Поместите лист диализной мембраны поверх фильтровальной бумаги.
8. Поместите лист фильтровальной бумаги, пропитанной анодным буфером II, поверх диализной мембраны.
9. Повторяйте шаги 4-8 до полного комплектования пакета переноса (с учетом максимального количества гелей для данного прибора).
10. Поместите три листа фильтровальной бумаги, пропитанной катодным буфером, поверх последнего геля.
11. Поместите пластину катодного электрода поверх собранного пакета..

Важно: Следует избегать ударов/толчков крышки катодной пластины при работе системы, поскольку это может нарушить увязку пакета переноса и привести к ошибочным результатам

Перенос белка

1. Вставьте черный катодный вывод (-) в катодный штекер пластины.
2. Вставьте красный анодный вывод (+) в анодный штекер пластины.
3. Подключите анодный и катодный выводы к соответствующим разъемам на источнике тока.
4. Включите ток на источнике питания.
5. Установите параметры тока и выполните прогонку согласно времени, указанного в следующей таблице

Плотность тока	Лимит времени
0,8 мА/см ² *	1-2 часа
1.2 мА/см ²	1 час
2.5 мА/см ²	30-45 минут
4.0 мА/см ²	10-30 минут

**Площади поверхности (см²) рассчитывается исходя из размеров отпечатка сборного пакета переноса на анодной пластине. Это значение не зависит от количества гелей в пакете.

6. Отключите ток после завершения процесса переноса.
7. Отключите выводы подключения тока системы.
8. Снимите крышку .
9. Снимите и выбросьте слои фильтровальной бумаги.
Примечание: При использовании графитовых электродных пластин частицы графита от анодной пластины могут иногда оставаться на фильтровальной бумаге. Эти частицы не влияют на рабочий процесс.
10. Удалите гель.
11. Снимите мембрану блоттинга с помощью пинцета.

Протоколы визуализации белков – см. стр. 45;

протоколы иммунодетекции – см. стр. 48.

Протокол 1.3

Дот-блоттинг/Слот-блоттинг : Метод вакуумной фильтрации

Следующий протокол описывает типичную процедуру фильтрации белков на мембране для переноса Immobilon® PVDF. Для дополнительной информации смотрите инструкцию, прилагаемую к вашей системе блоттинга

► **Совет:** Детергенты могут ингибировать связывание белков с мембранами для переноса Immobilon® PVDF.

► **Рекомендуется** – Вязкие образцы необходимо разбавлять буфером для снижения вязкости.

Необходимое оборудование и растворы

- Два листа мембраны для переноса Immobilon® PVDF, нарезанные по размеру устройства для блоттинга.
- Фильтровальная бумага, нарезанная по размеру устройства для блоттинга.
- Метанол 100%.
- Вода Milli-Q®.
- Буфер для загрузки образцов и промывки.
- Устройство для блоттинга, в формате дот-блот или слот-блот.

Постановка

1. Подготовьте мембрану

a. Намочите мембрану в метаноле в течение 15 секунд. Мембрана должна равномерно измениться, от непрозрачной до полупрозрачной.

b. Аккуратно положите мембрану в воду Milli-Q® и оставьте намокать на 2 минуты.

c. Аккуратно поместите мембрану в буфер и оставьте для уравнивания в течение не менее 5 минут.

2. Растворите образец в буфере. Если раствор образца мутный, центрифугируйте его для удаления частиц. Если образец вязкий, разбавьте его дополнительным количеством буфера.

Сборка системы блоттинга

Подробные инструкции по сборке смотрите в руководстве по эксплуатации от производителя.

1. Поместите один лист увлажненной фильтровальной бумаги в устройство. В некоторых устройствах может потребоваться несколько листов.
2. Поместите два листа мембраны поверх фильтровальной бумаги*.
3. Закройте устройство.
4. Подключите к вакуумной линии.

Перенос белка

1. Быстро приложите вакуум, чтобы удалить избыток буфера. 2. Отключите вакуум и аккуратно внесите образцы в лунки с помощью пипетки. 3. Подключите вакуум к устройству блоттинга. 4. После того, как все образцы отфильтруются через мембрану, отключите вакуум. 5. Добавьте буфер в каждую лунку, чтобы смыть образцы со стенок. Примените вакуум, чтобы удалить фильтрацией промыточный буфер. 6. После того, как промыточный буфер полностью отфильтруется через мембрану, отключите вакуум. 7. Чтобы снять блот, откройте устройство блоттинга. 8. Аккуратно удалите мембрану, используя пинцет. Протоколы визуализации белков – см. стр. 45; протоколы иммунодетекции – см. стр. 48.

* Чтобы структура микропористой мембраны не деформировалась при помещении ее в устройство блоттинга, рекомендуется помещать второй лист мембраны между фильтровальной бумагой и первичной мембраной

Протокол 1.4

Спот-блоттинг: ручной метод **Необходимое оборудование и растворы**

- Мембрана для переноса Immobilon® PVDF.
- Фильтровальная бумага, нарезанная по размеру мембраны для переноса
- Бумажные салфетки.
- Метанол 100%.
- Буфер.

Постановка

1. Подготовьте мембрану:
 - а. Намочите мембрану в метаноле в течение 15 секунд. Мембрана должна равномерно измениться, от непрозрачной до полупрозрачной.
 - б. Аккуратно положите мембрану в воду Milli-Q® и оставьте намокать на 2 минуты.
 - с. Аккуратно поместите мембрану в буфер и оставьте для уравнивания в течение не менее 5 минут.
2. Если раствор образца мутный, центрифугируйте его для удаления частиц. Если образец вязкий, разбавьте его дополнительным количеством буфера.

Сборка пакета переноса белков

Соберите пакет следующим образом

(по направлению снизу вверх):

1. Поместите бумажные салфетки на рабочую поверхность. Примечание: Нижние салфетки должны оставаться сухими в течение процедуры блоттинга.
2. Поместите сухую фильтровальную бумагу (т.е., Whatman® 3 мм) на бумажные салфетки.
3. Поместите фильтровальную бумагу (предварительно смоченную в буфере) на сухую фильтровальную бумагу.
4. Поместите предварительно смоченную мембрану на влажную фильтровальную бумагу.

Перенос белка

1. Нанесите 1-5 μl образца на мембрану. Образец должен впитаться в мембрану.

Примечание: Мембрана должна быть достаточно влажной, чтобы впитывать образцы, но слишком влажной, чтобы образцы не «расползались» по мембране.

2. После поглощения образца поместите мембрану на чистую фильтровальную бумагу для высыхания.

Протокол 1.5 Оптимизация блокирующих реагентов

Необходимое оборудование и растворы

- Небольшой лист мембраны для переноса Immobilon® PVDF.
- Лист фильтровальной бумаги, обрезанный по размеру мембраны.
- Метанол 100%.
- Промывочный буфер: фосфатный буферный солевой раствор (PBS) или Трис-буферный солевой раствор (TBS), содержащий 0,05-0,1 % Tween®-20 ПАВ.
- Тестовый блокирующий раствор(ы).
- Тестовые реагенты для обнаружения.

Постановка

1. Подготовьте мембрану:

а. Намочите мембрану PVDF в метаноле в течение 15 секунд. Мембрана должна равномерно измениться, от непрозрачной до полупрозрачной.

б. Аккуратно положите мембрану в воду Milli-Q® и оставьте намокать на 2 минуты.

с. Аккуратно поместите мембрану в буфер и оставьте для уравнивания в течение не менее 5 минут при осторожном встряхивании.

2. Намочите фильтровальную бумагу в промывочном буфере.

Процедура

1. Поместите мембрану на влажную фильтровальную бумагу.

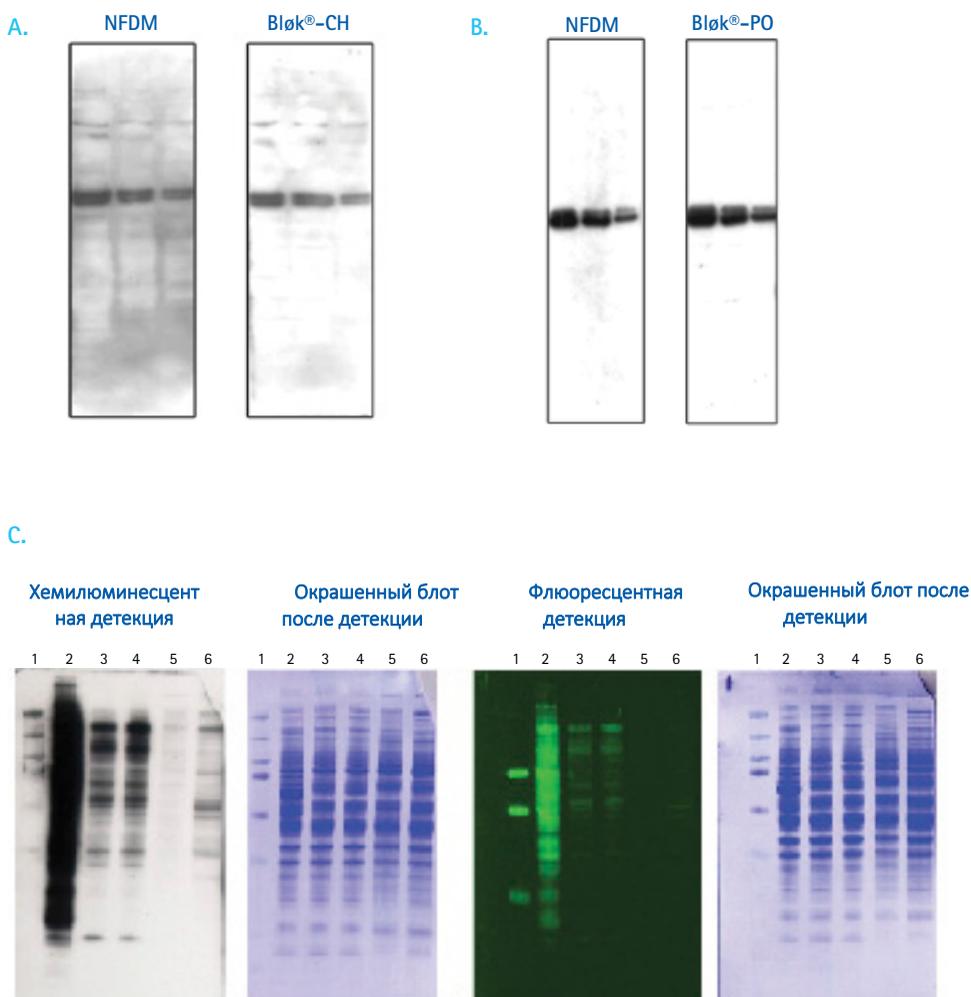
2. Нанесите 5 μl блокирующего раствора на мембрану и дайте ей полностью впитаться.

3. Добавьте в блот реагенты обнаружения и инкубируйте в течение 5 минут.

4. Слейте избыток реагентов.

5. Накройте блот чистой пищевой пленкой или полиэтиленовым защитным файлом и удалите пузырьки воздуха.

6. Экспонируйте блот на подходящую рентгеновскую пленку в течение нескольких минут. Появление на пленке черных пятен указывает на наличие перекрестной реактивности между блокирующим реагентом и субстратом для обнаружения.



Полоса 1: маркер молекулярной массы; Полоса 2: перванадат-стимулированный A431; Полоса 3: нестимулированный A431 (контроль); Полоса 4: EGF-стимулированный A431; Полоса 5: нестимулированный A431 (контроль); Полоса 6 : EGF-стимулированный A431

Рисунок 19.

Реагенты для шумоподавления Bløk®, характеризующиеся оптимизированным составом для хемилюминесцентных, флуоресцентных и фосфопротеиновых методов обнаружения, обеспечивают превосходное соотношение «сигнал-шум», а также позволяют проводить окрашивание мембраны после обнаружения.

(А) Хемилюминесцентная детекция p53 в EGF- стимулированном лизате A431 (10-2,5 µg на полосу, Кат. № : 12-110). Блоты были блокированы NFDM или реагентом Bløk®-CH, а затем исследованы с анти-p53 антителом (1:1000, Кат. № : AB565), разведенном в реагенте Bløk®-CH. Полосы определяли с использованием субстрата Luminata™ Forte Western HRP (Кат. № : WBLUF0500). NFDM = обезжиренное сухое молоко.

(В) Хемилюминесцентная детекция pERK в EGF- стимулированном лизате A431 (10-2,5 µg на полосу, Кат. № : 12-110). Блоты были блокированы NFDM или реагентом Bløk®-CH, а затем исследованы с анти-pERK антителом (1:10000, Кат. № : 05- 797R), разведенном в реагенте Bløk®-CH. Полосы определяли с использованием субстрата Luminata™ Forte Western HRP (Кат. № : WBLUF0500).

(С) Два блота, содержащие разные образцы клеточного лизата A431, свежеприготовленные (полосы 2-4) и старые (5-6) образцы, были нормализованы к 10 µg общего белка на полосу. Блоты были исследованы с анти-фосфотирозином, клон 4G10® и выявлены методами хемилюминесценции (два блота слева) и флуоресценции (два блота справа). Полосы 5 и 6 демонстрируют более слабый сигнал, чем полосы 3 и 4 в обоих методах обнаружения. Окрашивание Coomassie® blue (сразу после иммунодетекции) исключило возможности ошибок, связанных с загрузкой и переносом.

Протокол 1.6

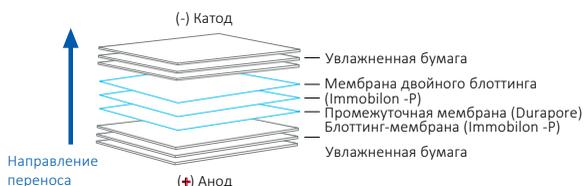
Двойной блоттинг (Double Blotting): инновационная процедура для устранения неспецифического связывания вторичных антител

Необходимое оборудование и растворы

- Аппарат для полусухого переноса.
- Два листа мембраны Immobilon®-P (блот и двойной блот/ blot and double-blot).
- Гидрофильная PVDF-мембрана Durapore®, 0,65 мкм диаметр пор (Кат. № DVPP 000 10).
- Фильтровальная бумага.
- 0,7 % (по объему) раствор уксусной кислоты.
- Фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), pH 7,4.

Процедура

1. Разложить белки на мембрану Immobilon®-P с применением блоттинга; провести блокировку; применить первичное антитело и промыть, как описано в Протоколе 3.1. Стандартный метод иммунодетекции, стр. 48.
2. Нарезьте две стопки фильтровальной бумаги и лист мембраны Durapore® по размеру мембран.
3. Погрузите мембрану Durapore® в раствор кислоты минимум на 10 минут. Предварительно смочите мембрану двойного блоттинга Immobilon-P® (неиспользованную) в метаноле в течение 3 секунд, затем 2 минуты промывайте в воде и оставьте для уравнивания в растворе кислоты на 10 минут. Увлажните стопки фильтровальной бумаги раствором уксусной кислоты путем капиллярного всасывания.
4. Поместите блоттинг-мембрану поверх стопки фильтровальной бумаги и накройте ее мембраной Durapore® и мембраной двойного блоттинга. Быстро поместите вторую стопку фильтровальной бумаги на мембрану двойного блоттинга, чтобы предотвратить высыхание. Поместите «сэндвич» в аппарат так, чтобы блоттинг-мембрана была обращена к аноду, а мембрана двойного блоттинга – к катоду..



5. Создайте постоянную напряженность поля 0,8 мА/см² в течение 10 минут.

6. Разложите «сэндвич» на слои.

7. Промойте мембрану двойного блоттинга дважды в PBS, используя каждый раз свежий буфер.

8. Блокируйте мембрану двойного блоттинга двойной пятно мембраны.

9. Если повторно прогнать исходную блоттинг-мембрану (на которой сохранились разложенные белки) с тем же или другим первичным антителом, ее можно хранить в PBS после кислотного переноса.

10. Продолжайте исследование мембраны двойного блоттинга с соответствующим вторичным антителом и детекцией белка, как описано в Протоколе 3.1. Стандартный метод Иммунодетекции, стр. 48.

Пояснения по двойному блоттингу см. на стр. 29-30 .

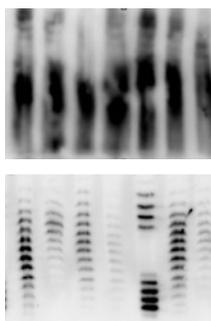


Рисунок 20.

Изоэлектрическое схемы эндогенного почечного эритропоэтина (EPO) в отсутствие (вверху) и при проведении (внизу) двойного блоттинга. Данные любезно предоставлены Dr. Françoise Lasne, Laboratoire National de Dépistage du Dopage.

Протокол 1.7

Методы сушки мембран

Прежде чем перейти к процедурам визуализации/ трансиллюминации или экспресс-методам иммунодетекции, мембрана должна быть высушена. После проведения блоттинга белков на мембрану, ее надо промыть водой Milli-Q®. По мере высыхания мембрана становится непрозрачной. В таблице ниже представлены подробности четырех методов сушки и временных затрат. Во всех случаях необходимо соблюдать полное время сушки, чтобы гарантировать полное удаление жидкости из пористой структуры мембраны.

► **Совет:** Оставьте мембрану до полного высыхания, прежде чем перейти к процессам трансиллюминации или экспресс-иммунодетекции.

Метод высушивания	Требуемое время *
Смочите в 100% метаноле 10 секунд. Удалите метанол через 15 минут и поместите на лист фильтровальной бумаги до полного высыхания.	1,5 минуты
Закрепите между двумя листами фильтровальной бумаги и поместите на 30 минут в вакуумную камеру.	30 минут
Инкубируйте при 37 °C	1 час
Поместите на стол и дайте высохнуть при комнатной температуре.	2 hours

*Longer times required in higher humidity environments.

2. Визуализация белков

Следующие протоколы описывают типичные процедуры окрашивания белков, иммобилизованных на PVDF-мембране для переноса Immobilon®.

Примечание: При исследовании окрашенных блотов лучшая степень контрастности отмечается, пока мембрана еще влажная. Для фотографирования используйте влажные блоты и свет, проходящий через мембрану.

- ▶ **Совет:** перед проведением иммунодетекции должны быть использованы только методы обратимого окрашивания или трансиллюминации.
- ▶ **Совет:** Чтобы визуализировать слабо-контрастные полосы, увеличьте концентрацию метанола до 40%.

Протокол 2.1 Визуализация методом трансиллюминации

Трансиллюминация представляет собой неразрушающий обратимый метод (Reig and Klein, 1988), основанный на изменении вида ПВДФ от непрозрачного до полупрозрачного после увлажнения метанолом. 20% метанол смачивает участки мембраны, покрытые белками, и не смачивает свободные от белка участки.

- ▶ **Совет:** При разработке нового протокола переноса белков или при работе с новым типом образцов проводите окрашивание геля, чтобы убедиться в том, что все белки элюировали из геля.

При помещении в световую камеру полосы белка имеют вид светлых участков. Чувствительность обнаружения сопоставима с окрашиванием красителем кумасси (Coomassie® Brilliant Blue R), при использовании в сочетании с фотографированием.

Необходимое оборудование и растворы

- 20% (по объему) метанол.
- Неглубокий планшет, достаточно большой, чтобы вмещать мембрану.
- Камера белого света.
- Черная бумага.

Процедуры

1. Полностью просушите блот, используя один из методов сушки по Протоколу 1.7. Методы сушки мембран, стр.44.
2. Налейте в планшет достаточное количество 20% метанола, чтобы покрыть блот.
3. Поместите блот в 20% метанол на 5 минут.
4. Поместите блот в световую камеру и закройте участки вокруг блота листом черной бумаги.
5. Полосы проявляются в виде светлых участков на непрозрачном фоне (Рис.10, блот А, стр.24).
6. Если желательно иметь постоянную запись (гель-документирование?), сфотографируйте влажный блот.
7. После того, как метанол полностью высохнет, блот вернется к своему первоначальному виду.

Протокол 2.2

Визуализация обратимым окрашиванием

Понсеу-S Red

Этот краситель дает розовые полосы на светлом фоне.

Необходимое оборудование и растворы

- Краситель: 0,2% Ponceau-S red, 1% уксусная кислота. Готовится разведением стокового раствора (2% краски в 30% (масса/объем) трихлоруксусной кислоты и 30% (масса/объем) сульфосалициловой кислоты) 1:10 в 1% (по объему) уксусной кислоты.
- Метанол 100%.
- 0,1 N NaOH.
- Вода Milli-Q®.
- Неглубокий планшет, достаточно большой, чтобы вмещать мембрану.

Процедуры

1. Если блот сухой, увлажните его в 100% метаноле.
2. Налейте в планшет достаточный объем красителя, чтобы покрыть блот.
3. Поместите блот в краситель на 1 минуту, при помешивании.
4. Выньте блот и тщательно промойте его водой Milli-Q® до получения желаемого уровня контрастности.
5. Чтобы полностью удалить краситель, промойте блот 0.1 N NaOH.

Медь-фталоцианинтетрасульфоновая кислота (CPTS)

Этот краситель дает бирюзовые голубые полосы на светлом фоне .

Необходимое оборудование и растворы

- Краситель: 0,05% (масса/объем) CPTS в 12 мМ HCl.
- Обесцвечивающий раствор I: 12 мМ HCl.
- Обесцвечивающий раствор II: 20% (по объему) метанол.
- Метанол 100%.
- Вода Milli-Q®.
- Обесцвечивающий раствор для белков: 0,5 M NaHCO₃.
- Неглубокий планшет, достаточно большой, чтобы вмещать мембрану.

Процедуры

1. Если блот сухой, увлажните его в 100% метаноле.
2. Налейте в планшет достаточный объем красителя, чтобы покрыть блот.
3. Поместите блот в краситель на 1 минуту, при помешивании.
4. Поместите блот в обесцвечивающий раствор I, чтобы удалить избыток красителя и получить желаемую степень контрастности.
5. Чтобы полностью удалить краситель с фона, промойте блот обесцвечивающим раствором II.
6. Чтобы полностью обесцветить белки, помешивайте блот в растворе для обесцвечивания белков до полного удаления красителя.

Протокол 2.3

Визуализация необратимым окрашиванием

Coomassie® Brilliant Blue R Dye

Этот краситель дает темные полосы на светлом фоне.

Важно: Данный краситель может создавать помехи при иммунодетекции.

Необходимое оборудование и растворы

- Краситель: 0,1% (масса/объем) кумасси бриллиантовой голубой (Coomassie® Brilliant Blue R) в 50% (по объему) метаноле, 7% (по объему) уксусная кислота.
- Обесцвечивающий раствор I: 50% (по объему) метанол, 7% (по объему) уксусной кислоты.
- Обесцвечивающий раствор II: 90% (по объему) метанол, 10% (по объему) уксусная кислота.
- Метанол 100%.
- Вода Milli-Q®.
- Неглубокий планшет достаточно большой, чтобы вмещать мембрану.

Процедуры

1. Если блот сухой, увлажните его в 100% метаноле.
2. Налейте в планшет достаточный объем красителя, чтобы покрыть блот.
3. Поместите блот в краситель на 2 минуты, при помешивании.
4. Выньте блот и быстро промойте его водой Milli-Q®.
5. Поместите блот в обесцвечивающий раствор I и взбалтывайте в течение 10 минут, чтобы удалить избыток красителя.
6. Поместите блот в обесцвечивающий раствор II и взбалтывайте в течение 10 минут, чтобы полностью обесцветить фон.

Амидо-черный

Этот краситель дает темные полосы на светлом фоне.

Важно: Данный краситель может создавать помехи при иммунодетекции.

Необходимое оборудование и растворы

- Краситель: 0,1% (масса/объем) амидо-черный в 25% (по объему) изопропанол, 10% (по объему) уксусная кислота.
- Обесцвечивающий раствор: 25% (по объему) изопропанол, 10% (по объему) уксусная кислота.
- Метанол 100%.
- Вода Milli-Q®.
- Неглубокий планшет достаточно большой, чтобы вмещать мембрану.

Процедуры

1. Если блот сухой, увлажните его в 100% метаноле.
2. Налейте в планшет достаточный объем красителя, чтобы покрыть блот.
3. Поместите блот в краситель на 2 минуты, при помешивании.
4. Выньте блот и быстро промойте его водой Milli-Q®.
5. Поместите блот в обесцвечивающий раствор и взбалтывайте в течение 5-10 минут, чтобы удалить избыток красителя.

3. Иммунодетекция

Протокол 3.1 Стандартный метод иммунодетекции

Стандартный метод иммунодетекции проводится на разделенных («блоттированных») белках сразу после электропереноса. Если мембрана была высушена после переноса, тщательно смочите блот в метаноле в течение 5 минут перед тем, как приступить к иммунодетекции. Незанятые (свободные) связывающие участки мембраны блокируются на влажном блоте с помощью оптимизированных реагентов (см. Протокол 1.5. Оптимизация блокирующими реагентами, стр. 41). Недостатком данного метода является необходимость введения этапа блокировки, а также общее время процесса, составляющее более 4-х часов. Преимущество состоит в том, что стандартная иммунодетекция менее требовательна к оптимизации для работы с новыми типами образцов.

► **Совет:** мембрана для переноса Immobilon®-P^{5Q} имеет меньший размер пор (0,2 мкм) и большую площадь поверхности, по сравнению с мембраной Immobilon-P® (0,45 мкм). Поэтому при работе с Immobilon®-P^{5Q} можно ожидать повышения фона и, соответственно, необходимо корректировать этапы блокировки и промывки.

► **Совет:** Фосфатазы в блокирующем растворе могут дефосфорилировать блоттированные белки.

► **Совет:** Не используйте азид натрия в буферах, так как он ингибирует активность HRP (пероксидазу хрена).

► **Рекомендуется** - Не допускайте высыхания блотов в процессе блокировки и после нее.

► **Совет:** Если поместить в контейнер несколько (более одного) блотов, недостаточный объем буфера может привести к слипанию блотов между собой.

► **Совет:** Сухое порошковое молоко нельзя использовать с системами биотин-авидин.

► **Совет:** Чувствительность хромогенной детекции обычно как минимум на порядок ниже, чем для хемилюминесцентной детекции.

► **Совет:** Высокий уровень неспецифического сигнала можно снизить повышением разведения первичных антител или снижением белковой нагрузки на гель.

► **Совет:** мембраны Immobilon®-FL можно сканировать как в сухом, так и во влажном состоянии.

► **Совет:** Высокий общий фон (шум) можно минимизировать повышением разведения первичных антител, конъюгированных с ферментом.

Необходимые растворы

- Первичные антитела (специфичные для исследуемого белка).
- Вторичные антитела (специфичные для первичных антител), меченые щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена.
- Субстрат, соответствующий ферментному конъюгату.
- Фосфатно-солевой буфер (PBST): 10 мМ фосфата натрия, pH 7,2; 0,9 % (масса/объем) NaCl; до 0,1 % детергента Tween®-20.
- TBST: 10 мМ Трис, pH 7,4; 0,9 % (масса/объем) NaCl, до 0,1 % Tween®-20.
- Блокирующий раствор: 1% (масса/объем) БСА (бычий сывороточный альбумин); 0,05% Tween® -20.
- Вода Milli-Q®.

Необходимое оборудование

- Неглубокий планшет, достаточно большой, чтобы вмещать блот.
- Стеклопластины.
- Пластиковая упаковка (например, пленка Saran™), пакет для замораживания или полиэтиленовый файл.
- Пленка и кассета для автордиографии.
- Темная комната.
- Оборудование для обработки автордиографических пленок.

Постановка

1. Развести первичные антитела в блокирующем растворе до желаемой рабочей концентрации.
2. Развести вторичные антитела в блокирующем растворе до желаемой рабочей концентрации. Примечание: Необходимо приготовить достаточное количество раствора из расчета 0,1 мл раствора антител (первичных и вторичных) на 1 см² мембраны.

Инкубация антител

1. Поместите блот в блокирующий раствор и инкубируйте его в течение 1 часа, при помешивании.
2. Поместите блот в раствор первичных антител и инкубируйте его в течение одного часа при помешивании. Раствор должен свободно перемещаться по всей поверхности мембраны.
3. Поместите блот в PBS и промывайте в течение 10 минут. Повторить два раза, используя свежий буфер.
4. Поместите блот в раствор вторичных антител и инкубируйте его при комнатной температуре или 37 °C в течение 1 часа при перемешивании.
5. Поместите блот в PBS и промывайте в течение 10 минут. Повторить два раза, используя свежий буфер.
6. Переходите к проведению хромогенной, хемилюминесцентной или флуоресцентной детекции.

Хромогенная детекция

1. Приготовьте субстрат в соответствии с инструкцией производителя.
2. Поместите блот в чистый контейнер и добавьте субстрат, чтобы полностью покрыть поверхность мембраны. Инкубируйте в течение 10 минут при небольшом помешивании, или пока сигнал не достигнет желаемого уровня контрастности.
3. Промойте блот водой Milli-Q®, чтобы остановить реакцию.
4. Блот следует хранить в отсутствие прямого света, чтобы снизить его обесцвечивание. Блот можно хранить в сухом виде.

Хемилюминесцентная детекция

Следуйте инструкциям производителя.

1. Приготовьте субстрат в соответствии с инструкцией производителя.
2. Поместите блот в контейнер и добавьте субстрат, чтобы полностью покрыть поверхность мембраны. Инкубируйте в течение 1 минуты.
3. Слейте избыток субстрата.
4. Поместите блот на чистую стеклянную пластинку и заверните в полиэтиленовую пленку.
Примечание: Можно также использовать обрезанную по размеру защитную файловую пленку или пакет для заморозки.
5. Аккуратно разгладьте, чтобы удалить все пузырьки воздуха.
6. В темной комнате поместите завернутую мембрану в кассету с пленкой.
7. Поместите лист автордиографической пленки сверху и закройте кассету.
8. Экспонируйте пленку. Чтобы определить оптимальное время экспозиции, необходимо сделать несколько экспозиций, от 15 секунд до 30 минут. Обычно этот показатель находится в пределах 1-5 минут.

Флуоресцентная детекция

Необходимое оборудование

- Белки, перенесенные на мембрану Immobilon®-FL, и исследованные с антителами.
- Пленка Mylar®.
- Аппаратура для флуоресцентной съемки.

Ниже приводится общий протокол флуоресцентной иммунодетекции. Для получения оптимальных результатов обратитесь к протоколу производителя, который прилагается к набору реагентов.

Примечание: При использовании хемифлуоресцентных реагентов следуйте инструкциям производителя.

1. Поместите блот в разведенный раствор вторичных антител меченых флуоресцентным красителем и инкубируйте в течение 1 часа при легком встряхивании.
2. Промойте блот промывочным буфером 3-5 раз, каждый раз в течение 5 минут.
3. Поместите блот на лист чистой фильтровальной бумаги и дайте ему просохнуть.
4. Используйте пленку Mylar®, если необходимо. Не пользуйтесь пленкой Saran™, потому что она допускает проходящий свет и гасит флуоресценцию.
5. Сделайте снимок блота, используя соответствующий флуоресцентный сканер.

Протокол 3.2 Экспресс-метод иммунодетекции

Преимущество экспресс-метода иммунодетекции состоит в том, что антитела не могут связываться с гидрофобной (несмоченной) поверхностью мембраны для переноса Immobilon®-P, но связываются с белками, иммобилизованными на мембране. Экспресс-метод иммунодетекции совместим как с хромогенными, так и с хемилюминесцентными субстратами.

Совет: Используйте экспресс-метод иммунодетекции для быстрой визуализации большого количества белков. Если требуется более высокая чувствительность, используйте стандартный метод иммунодетекции, стр. 48.

Основное преимущество экспресс-иммунодетекции состоит в том, что не требуется этап блокирования, что экономит время и исключает связанные с этим риски (Mansfield, 1994). Кроме того, количество необходимых промывок сокращается, поскольку избыточные антитела не связываются с сухой мембраной. В результате общее время анализа не превышает 2 часов, в отличие от стандартного метода, на который затрачивается свыше 4 часов. Важно: Блот должно быть тщательно просушено перед началом экспресс-иммунодетекции. См. Протокол 1.7. Методы сушки мембран, стр. 44.

Необходимые растворы

- Первичные антитела (специфичные для исследуемого белка).
- Вторичные антитела (специфичные для первичных антител), меченые щелочной фосфатазой или пероксидазой хрена.
- Субстрат, соответствующий ферментному конъюгату.
- Забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS): 10 мМ фосфат натрия, pH 7,2; 0,9% (масса/объем) NaCl.
- Буфер для разведения антител: 1% (масса/объем) BSA (бычий сывороточный альбумин); 0,05% детергент Tween®-20.
- Метанол 100%.
- Вода Milli-Q®.

Необходимое оборудование

- Неглубокий планшет, достаточно большой, чтобы вмещать блот.
- Пластиковая упаковка (например, пленка Saran™), пакет для замораживания или защитный полиэтиленовый файл.
- Пленка и кассета для автордиографии.
- Темная комната и оборудование для обработки автордиографических пленок.

Постановка

1. Полностью просушите блот, используя один из методов сушки по Протоколу 1.7. Методы сушки мембран, стр.44. Не смачивайте блот в метаноле повторно.

2. Разведите первичные антитела в буфере для разведения до желаемой рабочей концентрации.

3. Разведите вторичные антитела в буфере для разведения до желаемой рабочей концентрации.

Примечание: Необходимо приготовить достаточное количество раствора из расчета 0,1 мл раствора антител (первичных и вторичных) на 1 см² мембраны.

Инкубация антител

1. Поместите блот в раствор первичных антител и инкубируйте его в течение одного часа при помешивании. Раствор должен свободно перемещаться по всей поверхности мембраны.

2. Поместите блот в PBS и промывайте в течение 5 минут.

Повторить два раза, используя свежий буфер.

3. Поместите блот в раствор вторичных антител и инкубируйте его в течение 30 минут при помешивании.

5. Поместите блот в PBS и промывайте в течение 5 минут.

Повторить два раза, используя свежий буфер.

6. Переходите к проведению хромогенной, хемилюминесцентной или флуоресцентной детекции как описано в Протоколе 3.1, Стандартные методы иммунодетекции, стр. 48.

Протокол 3.3

Экспресс-метод иммунодетекции с использованием системы SNAP i.d.® 2.0

Система обнаружения белков SNAP i.d.® 2.0 представляет собой второе поколение метода обнаружения иммунореактивных белков SNAP i.d.® на вестерн-блотах. В этой уникальной системе, управляемой вакуумом, реагенты протягиваются через мембрану, при этом увеличивается контакт между реагентами и внутренней частью мембраны, независимо от медленной диффузии и перемешивания. Такое усовершенствование трехмерного распределения реагента сокращает время, необходимое для иммунодетекции. В то время как традиционный процесс вестерн-блоттинга занимает от 4 до 24 часов (блокирование, инкубация антител и этапы промывки), по протоколу SNAP i.d.® 2.0 требуется всего 30 минут – без потерь интенсивности сигнала или снижения качества блота. Все этапы иммунодетекции действия после переноса белка на мембрану (т.е., блокирование, промывки, инкубации первичных и вторичных антител) могут быть выполнены в системе SNAP i.d.® 2.0.

Необходимые растворы

- Блокирующий реагент (обезжиренное сухое молоко 0,5 % или меньше, казеин, альбумин бычьей сыворотки BSA или другие блокирующие агенты промышленного производства, такие как реагент Bløck®-CH).
- Антитела (моноклональные и/или поликлональные).
- Реагенты для обнаружения.
- Промывочный буфер: Трис- или забуференный фосфатом физиологический раствор (pH 7,4), с добавлением ПАВ Tween®20 (TBST или PBST).

Необходимое оборудование

- Источник вакуума: насос или другой стандартный источник вакуума, обеспечивающий устойчивое минимальное давление 410 миллибар (12" рт.ст.) и 34 л/ мин.

ПРИМЕЧАНИЕ: могут быть использованы насосы серии Merck Millipore WP61 (химически стойкие насосы), но будут затрачивать больше времени на обработку.

- Вакуумный резервуар с пробкой (термос для сбора отходов) объемом 1 литр или более. Рекомендуется устанавливать фильтр Millex®-FA50 (или эквивалентный) между вакуумным резервуаром и источником вакуума для защиты источника вакуума от загрязнения.
- Вакуумные шланги для подключения вакуумного резервуара к источнику вакуума.
- Пинцет.
- Блот с перенесенными на него белками.

Постановка

1. Поместите основание SNAP i.d.® 2.0 на верхнюю часть уровневой поверхности.
2. Подключите вакуумный шланг к задней части системы, (вставить его в соответствующий разъем и потянуть вперед до щелчка)
3. Подсоединить другой конец шланга к источнику вакуума. Используйте термос 1л для в качестве ловушки и фильтр Миллекс®-FA50 (Кат. № SLFA05010) для защиты источника вакуума от загрязнения.

ПРИМЕЧАНИЕ: Подойдет любой источник вакуума с параметрами 410 миллибар (12" рт.ст.) и 34 л/ мин. Если источник вакуума работает при более высоком давлении (свыше 410 миллибар) система SNAP i.d.® 2.0 будет автоматически регулировать разрежение.

Сборка пакета блота и общий протокол

- Сборка пакета блота и общий протокол
1. Держите блота держатель за опорный слой (синие края) и увлажните мембранный слой (белый) дистиллированной водой в смачивающем лотке (поставляется в комплекте). Поместите держатель с увлажненным блотом на площадку прокатки.
 2. При необходимости, предварительно увлажните блот в метаноле и воде, затем поместите его в центре держателя блота, сторона с нанесенными белками снизу.
 3. Осторожно прокатайте блот, чтобы удалить пузырьки воздуха, затем закрыть держатель блота и прокатайте еще раз.
 4. Откройте рамку держателя блота, переверните держатель так, чтобы сторона с нанесенными белками была сверху, затем поместите его внутрь рамки. Выемка в держателе блота обеспечивает правильное размещение в рамке.
 5. Закройте и заблокируйте рамку. Добавьте 30 мл блокирующего раствора. Прижмите рамку и поверните ручку системы, чтобы включить вакуум. Когда рамка станет совершенно пустой, выключите вакуум.
 6. Нанесите 5 мл (для мини-блота) или 10 мл (для Midi-блота) первичного антитела по всей поверхности держателя блота.
 7. Инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре. Раствор будет всасываться в держатель блота и поверхность будет казаться сухой.
 8. Нажмите рамку вниз и включите вакуум. Подождите 5-8 секунд, пока рамка не опустеет полностью.
 9. Не выключая вакуум, добавьте 30 мл промывочного буфера. Повторите этап промывки 3 раза (в общей сложности четыре промывки). Когда рамка опустеет полностью, выключите вакуум.
 10. Нанесите равномерно 5 мл (для мини-блота) или 10 мл (для Midi-блота) вторичного антитела по всей поверхности держателя блота. Инкубируйте в течение 10 минут при комнатной температуре и отключении вакуума. Раствор опять будет всасываться в держатель блота и поверхность будет казаться сухой.

11. Прижмите рамку и включите вакуум. Подождите 5-8 секунд, пока рамка не опустеет полностью. Не выключая вакуум, добавьте 30 мл промывочного буфера. Повторите этап промывки 3 раза (в общей сложности четыре промывки).

12. Выключите вакуум и снимите держатель блета с рамки. Снимите блот с держателя и инкубируйте с соответствующим реагентом для обнаружения.

Расширенный состав первичных антител

Инкубация: от одного до 12 часов (оставить на ночь)

1. Выполните этапы с 1 по 5 из общего протокола .
2. Добавьте 5 мл (для мини-блета) или 10 мл (для Midi-блета) 1X первичных антител (концентрация, используемая для стандартной иммунодетекции) .

3. Накройте рамку держателя блета крышкой. Если необходимо, снимите с основы и инкубируйте при постоянном встряхивании. Если требуется оставить для инкубации на ночь, рекомендуется охлаждение. Хотя поверхность держателя блета может выглядеть частично сухой, блот не будет пересыхать, поскольку раствор остается в рамке.

ПРИМЕЧАНИЕ: При обработке более одного блета в течение длительного периода времени, можно составить рамки держателя блета так, чтобы уменьшить рабочее пространство.

4. Опционально: При восстановлении первичных антител поместите лотки с антителами на основу перед тем, как перейти к этапу 4 .

5. После длительного периода инкубации поместите рамку обратно на основу, снимите крышку и выполните этапы с 8 по 12 общего протокола.

ПРИМЕЧАНИЕ: Длительные периоды инкубации для вторичных антител в системе SNAP i.d.® 2.0 не требуются. Рекомендуется концентрация 5X для вторичных антител в течение 10 минут.

Восстановление антител

1. Выполните этапы с 1 по 5 из общего протокола, но увеличьте время действия вакуума до 2 минут, чтобы обеспечить полное удаление блокирующего раствора из канавок и каналов рамки.

2. Снимите рамку-держатель блета с основы и вытрите всю оставшуюся жидкость с нижней части рамки бумажным полотенцем (салфеткой).

3. Поместите лоток-сборник антител на основу, убедившись, что установочные отверстия в лотке-сборнике совпадают с установочными штифтами основы.

4. Поместите рамку-держатель блета обратно на основу.

5. Добавьте первичное антитело и инкубируйте как указано в этапе б и 7 общего протокола.

6. После инкубации в течение 10 минут, включите вакуум и подождите одну минуту, чтобы убедиться, что все антитела были собраны.

ПРИМЕЧАНИЕ: при обработке двух рамок одновременно, сначала примените вакуум с одной стороны, а затем с другой. Это гарантирует полную вакуумную силу для каждой рамки и улучшит восстановление объема.

7. Выключите вакуум и снимите рамку . Выньте лоток-сборник антител.

8. Перенесите антитела в подходящий контейнер для хранения или анализа.

9. Поместите рамку держатель блета в исходное положение и перейдите к этапу 9 общего протокола.

Протокол 3.4 Высокосолевая промывка для удаления постоянного фона

Необходимые растворы

- Высокосолевого буфера: буфер PBS или TBS с добавлением 0,5 М NaCl и 0,2% SDS

Процедуры

1. Следуйте протоколу 3.1. Стандартный метод иммунодетекции, стр. 48, для инкубации первичных и вторичных антител.
2. После инкубации вторичных антител, поместите блот в высокосолевого буфера и инкубируйте в течение 30 минут при осторожном встряхивании.
3. Промойте блот с водой Milli-Q® и приступите к процедуре хромогенной, хемилюминесцентной или флуоресцентной детекции белков, как описано в разделе Стандартный метод иммунодетекции, стр. 48.

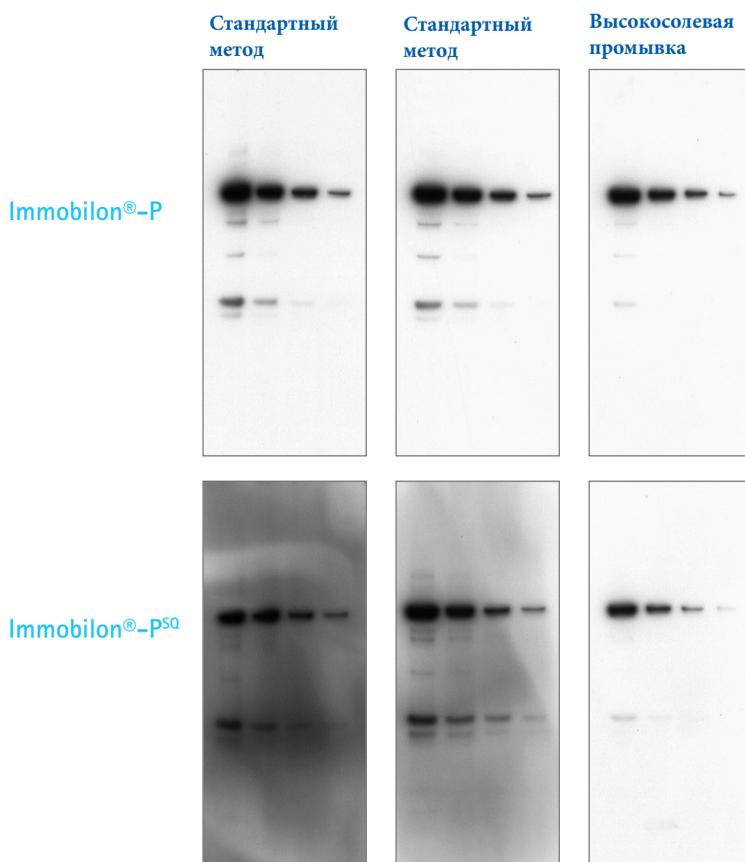


Рисунок 21.

Добавление 0,5 М NaCl и 0,2 % SDS в промывочный буфер значительно снизило фон на мембране Immobilon®-p^{5Q}, имеющей высокую способность к связыванию белка.

4. Очистка мембран

Ниже представлены два протокола для удаления антител из блотов. Первый применим к любой системе с хемилюминесцентным субстратом и использует сочетание детергента и теплоты, чтобы освободить антитела. Второй обычно используется в тех случаях, когда антитела должны быть отделены от антигена и при низком значении pH для изменения структуру антитела таким образом, чтобы участок связывания был неактивным.

Ни один метод не позволяет удалить окрашенные осадки, полученные в системах хромогенной детекции (например, BCIP , 4CN , DAB и TMB). Однако есть возможность проанализировать блот с другим антителом, специфичным к другому белку-мишени.

Важно: Не следует допускать высыхания блота между этапами иммунодетекции. Любые оставшиеся молекулы антител будут постоянно связываться с мембраной, если дать ей высохнуть.

Протокол 4.1 Удаление при помощи теплоты и детергента

Необходимое оборудование и растворы

- Раствор для очистки: 100 мМ 2-меркаптоэтанол, 2% (масса/объем) SDS , 62,5 мМ Трис-HCl, pH 6,7 .
- Забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS): 10 мМ фосфат натрия, pH 7,2; 0,9% (масса/объем) NaCl.
- Неглубокий планшет, достаточно большой, чтобы вмещать мембрану.

Процедуры

1. В вытяжном шкафу поместите блот в раствор для очистки и инкубируйте при помешивании при 50 °C в течение 30 минут.
2. Поместите блот в буфер и перемешивайте в течение 10 минут. Повторите со свежим буфером.
3. Дополнительно: Повторите исходный протокол обнаружения (опустив этап первичных антител), чтобы убедиться, что антитела были инактивированы или удалены из мембраны.
- 4 . Поместите блот в буфер и перемешивайте в течение 10 минут.
- 5 . Перейдите к этапу блокирования для следующего цикла иммунодетекции .

Протокол 4.2

Очистка при низком pH

Необходимое оборудование и растворы

- Раствор для очистки: 25 мМ глицин-HCl, pH 2, 1% (масса/объем) SDS .
- Буференный фосфатом физиологический раствор (PBS): 10 мМ фосфат натрия, pH 7,2, 0,9% (масса/объем) NaCl.
- Неглубокий планшет, достаточно большой, чтобы вмещать мембрану.

Процедуры

1. Поместите блот в раствор для очистки и встряхивайте в течение 30 минут.
2. Поместите блот в буфер и встряхивайте в течение 10 минут. Повторите со свежим буфером .
3. Перейдите к этапу блокирования для следующего цикла иммунодетекции.

Протокол 4.3

Очистка с помощью набора ReBlot™ Plus Western Blot Recycling Kit

Необходимое оборудование и растворы

- Стандартные блот или полоски блота на нитроцеллюлозной или PVDF/нейлоновую мембране.
- Блокирующий раствор.
- Пластиковая пленка для хранения блотов (которые не планируются к немедленному повторному исследованию).
- Дистиллированная вода для разведения реагента.
- Пластиковые лотки для инкубации блотов или полос блотов в растворах для очистки, промывки и блокирования.
- Контроль для положительной и отрицательной очистки.

Процедуры

Примечание: Блоты или отдельные полоски, которые будут повторно использованы, надо подготовить к очистке сразу же после их первого использования. Если очистку нельзя выполнить сразу, мембраны можно завернуть в поли-этиленовую пленку и хранить во влажном виде в PBS при 4 °C. **НЕ ХРАНИТЕ БЛОТЫ В СУХОМ ВИДЕ.**

1. Заполните пластиковый лоток соответствующим количеством Раствора 1X для очистки антител (поставляется в комплекте) .
2. С помощью пинцета или щипцов погрузите блот или полоски блотов в раствор для очистки. Инкубируйте при осторожном перемешивании в течение 15 минут при комнатной температуре.
3. Наполните чистый пластиковый лоток равным количеством блокирующего буфера. Можно использовать обычный блокирующий буфер, например, 20 мМ Трис-HCl , pH 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% Tween 20 , 5% сухое молоко или аналогичные.
4. Промойте блот два раза по 5 минут блокирующим буфером.
5. Теперь блот готов к повторному исследованию с антителами.

5. Расщепление белков

Протокол 5.1

Расщепление белка на мембране для масс-спектрометрии *

Данный метод описывает подготовку иммобилизованных на мембране для переноса Immobilon® PVDF белков для анализа методом масс-спектрометрии.

► Совет: Красители блотов на мембране, совместимые с методами масс-спектрометрии, включают кумасси синий Coomassie® Blue, амидо-черный и Sypro.

Необходимое оборудование и растворы

- 50 % р-р метанола в воде Milli-Q®.
- 30 % ацетонитрила, 50 мМ бикарбоната аммония.
- Трипсин, растворенный в воде Milli-Q®, в пропорции 0,1 мг/мл.
- 80 % р-р ацетонитрила в воде Milli-Q®.
- Вакуумная центрифуга.
- Пробирки для микроцентрифуги.
- MALDI-TOF матрицы.

Процедуры

1. Переносите белок из геля на мембрану (Протокол переноса белков, стр. 35-38).
2. Окрасьте блоттированную мембрану Coomassie® Brilliant Blue или амидо-черным (Протокол 2.3. Визуализация необратимым окрашиванием, стр. 47).

3. Промойте окрашенную мембрану водой и просушите.
 4. Вырежьте чистым скальпелем кусочки мембраны, содержащие исследуемые белки, и поместите в отдельные микроцентрифужные пробирки.
 5. Обесцветьте кусочки мембран 500 µL 50 % метанолом в течение 2 часов при комнатной температуре.
 6. Удалите супернатант и высушите мембрану.
 7. Добавьте 10 µL 30 % ацетонитрила, 50 мМ бикарбоната аммония и 4 µL трипсина в концентрации 0,1 мг/мл.
 8. Оставьте инкубироваться на ночь при комнатной температуре.
 9. Переносите супернатант в чистые микроцентрифужные пробирки.
 10. Извлеките пептиды с использованием 20 µL 80 % ацетонитрила в течение 15 минут с ультразвуком.
 11. Приготовьте пулы экстрактов с предыдущими супернатантами.
 12. Высушите гидролизаты в вакуумной центрифуге.
- Примечание: В качестве замены можно использовать наконечники пипетки Merck Millipore ZipTip®SCX для очистки и концентрации гидролизата пептида. Для этого вместо сушки. Чтобы сделать это, подкислите гидролизат 0,5% TFA (убедитесь, что pH < 3) и следуйте инструкциям Руководства пользователя Ziptip® SCX пипетки (Merck Millipore Lit. No. P36444).
13. Ресуспенсируйте каждый экстракт пептид в небольшом объеме 30% ацетонитрила, 0,1% TFA.
 14. Загрузите 1 -2 µL гидролизата на тарелку MALDI и смешайте с 1 µL матрицы.

* По Bienvenut и соавт., (1999)

6. Хранение блотов

Протокол 6.1

Подготовка белковых блотов к длительному хранению

PVDF представляет собой химически стойкий полимер с отличной долговременной стабильностью. Условия хранения блотов, которые необходимо хранить для дальнейшего использования, диктуются стабильностью белков, связанных с мембраной. Мы рекомендуем хранение при низкой температуре; для некоторых белков приемлемо хранение при комнатной температуре.

Необходимые материалы

- Просушенные блоттированные мембраны для переноса Immobilon® PVDF.
- Два листа ватмана® 3 мм.
- Два листа картона или плотной бумаги.
- Скрепки для бумаг.
- Пластиковый пакет.

Процедуры

1. Поместите сухой блот между двумя чистыми листами ватмана Whatman® 3MM.
2. Поместите «сэндвич» из блота и фильтровальной бумаги между двумя листами картона .
3. Скрепите стопку по краям. Скрепки не должны перекрывать блот .
- 4 . Поместите стопку в герметичный пластиковый пакет.
5. Закройте или запечатайте пакет.
6. Храните блот при желаемой температуре:
 - +4 °С – в течение срока до 2х недель
 - 20 °С - в течение 2 месяцев
 - 70° С - для длительного хранения

Примечание: Блоты, хранящиеся в морозильной камере, не должна подвергаться механическим воздействиям, т.к. это может привести к образованию разломов мембраны. Перед изъятием из пластикового пакета блот должен нагреться до комнатной температуры. Блоты могут также храниться во влажной среде при 4 °С в пластиковом пакете; для предотвращения роста бактерий надо добавить в пакет бактериоцид, например, азид натрия. Перед использованием азид должны быть тщательно вымыт из блота, т.к. он ингибирует активность HRP (пероксидазы хрена).

Поиск и устранение проблем с блоттингом

1. Дот/Слот Блоттинг (Фильтрация)

Симптом	Возможная причина	Способ устранения
Медленная фильтрация или отсутствие фильтрации образца через мембрану	Недостаточный вакуум	Убедитесь, что устройство для блоттинга надлежащим образом закрыто, и герметизирующая пленка не повреждена. Убедитесь, что источник вакуума (насос) функционирует нормально. Изолируйте все открытые лунки высококачественной лабораторной лентой. Повысьте уровень вакуума.
	Забиты поры мембраны	Отцентрифугируйте или отфильтруйте образцы, чтобы удалить частицы. Разбавьте вязкие образцы буфером.
Малое количество или отсутствие белка, наблюдаемое на блоте	Недостаточное количество белка нанесено на мембрану	Уменьшите разведение образца и отфильтруйте большее количество образца через мембрану.
	Детергенты (например, SDS) могут ингибировать связывание низкомолекулярных белков с мембраной	По возможности, исключите детергенты.
	Недостаточная чувствительность окрашивания	Используйте более чувствительный краситель.
Неоднородное окрашивание	Структура мембраны была сжата фильтровальной бумагой	Поместите вторую мембрану в устройство для блоттинга, чтобы защитить мембрану с образцами.
	Пузырьки воздуха внутри мембраны	Предварительно увлажните мембрану, поместив ее на поверхность метанола. Погружение мембраны может привести к захватыванию воздушных пузырьков.
	Мембрана не была предварительно увлажнена метанолом	Мембрану следует предварительно увлажнить метанолом; вся мембрана должна полностью и однородно изменить свой вид от непрозрачного до полупрозрачного.
	Воздушные пузырьки в образце	Чтобы избежать образования пузырьков, аккуратно наносите образцы в лунки с помощью пипетки.
	Загружен недостаточный объем образца	Образец должен полностью покрывать экспонируемую площадь мембраны.
Белок размазывается по мембране	Образец вытек из лунки	Убедитесь, что устройство для блоттинга собрано правильно, закрыто и изолировано перед началом фильтрации.
Белок размазывается по обратной стороне мембраны	Превышена емкость мембраны	Уменьшите количество белка, загружаемого в лунку.

2. Полусухой электроперенос или электроперенос в камере

Симптом	Возможная причина	Способ устранения
Смазанная/искаженная полоса	Мембрана неоднородно увлажнена метанолом	Всю мембрану необходимо предварительно полностью увлажнить метанолом; вся мембрана должна полностью и однородно изменить вид от непрозрачного до полупрозрачного.
	Воздушные пузырьки под мембраной и между другими слоями пакета переноса	С помощью пипетки или палочки для помешивания осторожно вытяните все захваченные пузырьки воздуха во время сборки пакета переноса
	Неравномерный контакт между гелем и мембраной	Убедитесь, что вся поверхность геля и поверхность мембраны имеют хорошее сцепление.
	В процессе переноса выделяется большое количество тепла	Температура прогонки не должна превышать 20 °С. Для переноса в камере предварительно охладите буфер или проводите перенос в холодной комнате. Для полусухого переноса сократите время прогона, увеличьте количество листов фильтровальной бумаги или уменьшите силу тока.
	Фильтровальная бумага высыхает во время полусухого переноса	Убедитесь, что фильтровальная бумага тщательно смочена перед началом процесса переноса или используйте дополнительные листы. Сборка пакета переноса должна занимать не более 15 минут.
	Перенос белков происходит слишком быстро, скопление белка на поверхности мембраны	Снизьте напряженность электрического поля.
Слабый сигнал	Белки проходят через мембрану	<p>Увеличьте время взаимодействия белков с мембраной за счет снижения напряжения, можно на 50%.</p> <p>Белки с высоким отрицательным зарядом (вследствие высокого содержания аспарагиновой и глутаминовой кислот) имеют свойство очень быстро перемещаться в электрическом поле. Снизьте напряжение, чтобы замедлить миграцию этих белков.</p> <p>Присутствие SDS в геле может ингибировать связывание белков. Уравновешивайте гель в буфере для переноса минимум в течение 15 минут.</p> <p>Слишком низкая концентрация метанола в буфере для переноса, чтобы обеспечить удаление SDS. Повысьте концентрацию метанола до 15–20%, особенно для более низкомолекулярных белков.</p> <p>Мембрана должна быть предварительно увлажнена метанолом; вся мембрана должна полностью и однородно изменить свой вид от непрозрачного до полупрозрачного. Перейдите на использование мембраны для переноса Immobilon®-p^{SQ}.</p>
	Белки остаются в геле	Если концентрация метанола в буфере для переноса слишком высокая, он может отделять SDS от белков и приводить к осаждению белков в геле. Это снижает перенос высокомолекулярных белков из геля. Если осаждение белков представляет проблему, в буфер для переноса можно добавить SDS (0.01%-0.05%), чтобы улучшить растворимость. Кроме того, избыток метанола может вызвать усадку или затвердение геля и, таким образом, препятствовать переносу высокомолекулярных белков.

2. Полусухой электроперенос или электроперенос в камере (продолжение)

Симптом	Возможная причина	Способ устранения
Слабый сигнал	Изоэлектрическая точка белка равна или близка к рН буфера для переноса	Белок, имеющий такую же изоэлектрическую точку, как и рН буфера для переноса, не имеет суммарного заряда и поэтому не будет мигрировать в электрическом поле. Чтобы обеспечить перенос, попробуйте использовать буфер с более высоким рН, такой как 10 mM CAPS буфер с рН 11, включая 10%-ный метанол или буфер с более низким рН, такой как буфер уксусной кислоты.
	Слабая детекция при использовании мочевины в геле и/или буфере для переноса	Снизьте температуру за счет использования циркуляционной постановки буфера или проводите перенос белков в холодной комнате. В присутствии теплоты мочевины может вызывать карбамилрование белков, что может изменить заряд аминокислот белка. Это повлияет на эпитопы, имеющие значение для распознавания и связывания антител
	Неполный перенос белков	Окрашивайте гель для проверки на остаточные белки. Если перенос был неполным, пересмотрите Вашу методику переноса
	Слабое удерживание белков	После завершения переноса обязательно полностью просушите мембрану, чтобы получить оптимальное связывание и фиксацию белков. Это необходимо делать до начала любого последующего метода обнаружения
Отсутствует сигнал	Отсутствует перенос белков	Проверьте ориентацию геля и мембраны во время процесса переноса. Для мониторинга переноса используйте предварительно окрашенные стандарты молекулярной массы.
Слабый перенос низкомолекулярных белков	Недостаточное удерживание белков SDS препятствует связыванию низкомолекулярных белков	Перейдите на использование мембраны для переноса Immobilon®-P ^{SQ} . Удалите SDS из раствора для переноса.
	Низкая концентрация метанола в буфере для переноса	Используйте более высокий процент концентрации (15%–20%) метанола в буфере для переноса.
	Недостаточное время для связывания белка	Связывание небольших белков на мембране можно улучшить применением более низкого напряжения.
	Ток не проходит через мембрану	Обрежьте мембрану и фильтровальную бумагу точно по размеру геля, не допускайте свисающих краев.
Слабый перенос высокомолекулярных белков (>80 кДа)	Слишком высокая концентрация метанола	Снижение концентрации метанола до 10% (по объему) или ниже поможет переносу высокомолекулярных белков за счет набухания геля. Кроме того, пониженный процент метанола также снизит потери SDS со стороны белков и снизит осаждение белков в геле. Белки <200 кДа не столь чувствительны к интерференции со стороны SDS при связывании с мембраной как белки с <100 кДа.
Слабый перенос положительно заряженных белков	Положительный суммарный заряд белков в буфере для переноса; белки движутся по направлению к катоду	Измените укладку пакета для переноса таким образом, чтобы мембрана Immobilon® была обращена к катодной стороне геля.
Слабый полусухой перенос	Ток не захватывает пакет геля	Убедитесь, что мембрана и фильтровальная бумага нарезаны точно по размеру геля и нависающие края отсутствуют.
Слабый перенос белков широкого диапазона молекулярной массы	Для переноса высоко- и низкомолекулярных белков требуются разные условия.	Обратитесь к публикации «Перенос белков широкого диапазона молекулярной массы может потребовать многоэтапного переноса». “Transfer of a broad MW range of proteins may require a multi-step transfer” (T. Otter et al., Anal. Biochem. 162:370-377 (1987)). Используйте трехбуферную систему для полусухого переноса (Протокол 1.2, стор. 36).

3. Визуализация белков

Симптом	Возможная причина	Способ устранения
Слабое обнаружение методами трансиллюминации	Несоответствующая мембрана	Методы трансиллюминации лучше всего работают с мембранами для переноса Immobilon®-P. Не рекомендуется использовать нитроцеллюлозные или Immobilon®-P ^{SQ} мембраны для переноса.
	Мембрана не была полностью просушена перед увлажнением ее метанолом	Обязательно полностью высушите мембрану после завершения переноса и перед погружением ее в 20% раствор метанола. Убедитесь, что Вы используете 20% раствор метанола.
	Блот насыщается только водой	Проведите насыщение блота 20% раствором метанола
	Недостаточно насыщенный блот	Увеличьте концентрацию метанола до 40%.
Слабое или неравномерное окрашивание	Мембрана не была увлажнена метанолом перед окрашиванием	Мембрану следует предварительно увлажнять метанолом; мембрана полностью и равномерно должна изменить свой вид от непрозрачного до полупрозрачного.
Неравномерные/пятнистые результаты	Используйте достаточный объем инкубационных растворов и обеспечьте полное покрытие мембраны этими растворами во время инкубации.	Используемый контейнер должен быть достаточно большим, чтобы раствор свободно перемещался через блот. Не инкубируйте более одного блота за один раз в одном контейнере. Кроме того, «белковая» сторона блота должна быть ориентирована вверх и не взаимодействовать с поверхностью дна контейнера.
	Воздушные пузырьки	Блот не должен содержать газовых пузырьков на поверхности. Осторожно протяните мембрану через край контейнера, чтобы удалить пузырьки.
	Низкое качество реагентов	Все буферы и реагенты должны быть свежими и не содержать частиц и загрязняющих веществ. Может потребоваться фильтрация буферов шприцевыми фильтрами Millex® или фильтровальными установками Stericup®, Steritor® или Steriflip®, а также центрифугирования растворов антител.
Высокий уровень окрашивания фона	Неспецифичное связывание белка с мембраной	Убедитесь, что Вы используете чистое оборудование и компоненты электропереноса, а также высококачественные реагенты и воду Milli-Q®.

4. Иммунодетекция

Симптом	Возможная причина	Способ устранения
Слабый сигнал	Несоответствующий блокирующий реагент	Блокирующий реагент может иметь аффинность с исследуемым белком и, таким образом, скрывать белок для обнаружения. Попробуйте использовать другой блокирующий агент и/или сократить количество блокирующего агента и время его экспозиции.
	Недостаточное время реакции антител	Увеличьте время инкубации.
	Концентрация антител слишком низкая, или антитела неактивны	Изменение титра или активности антител может быть вызвано многократной заморозкой и оттаиванием или бактериальным заражением раствора антител. Увеличьте концентрацию антител или приготовьте свежий раствор.
	Просроченные реактивы для детекции	Используйте свежий субстрат и правильно храните его. Просроченный субстрат может снизить чувствительность.
	Проблемы с переносом белка	Оптимизируйте перенос белка (см. выше).
	Блот высыхает в ходе хромогенной детекции	Если при использовании системы хромогенной детекции выявляется слабая контрастность, это может быть следствием того, что блот высох. Попробуйте заново намочить блот в воде, чтобы увеличить контрастность.
	Водопроводная вода деактивирует реагенты хромогенной детекции	Для подготовки реагентов используйте очищенную воду Milli-Q®.
	Азид ингибирует HRP	Не используйте азид в растворах для блоттинга.
	Слишком низкая конц. антигенов	Зарядите больше антигенов в гель перед проведением блоттинга.
Отсутствует сигнал	Слишком низкая конц. антител	Увеличьте концентрацию первичных и вторичных антител.
	Ингибирование HRP	В растворах, содержащих азид натрия, не следует использовать антитела, меченые HRP.
	Первичное антитело индуцировано против нативного белка	Разделите белки в денатурирующем геле или используйте антитело индуцированное против денатурированного антигена
Неравномерный блот	Отпечатки пальцев, следы сгибов или отпечатки от пинцета на блоте	Избегайте прикосновения к мембране или ее свертывания; используйте перчатки и пинцет с плоскими краями.
Пятнистый фон	Присутствие скоплений (агрегатов) в блокирующем реагенте	Отфильтруйте раствор блокирующего реагента через шприцевую фильтровальную насадку Millex® 0,2 мкм или 0,45 мкм
	Агрегаты во вторичном антителе, конъюгированном с HRP	Отфильтруйте раствор вторичных антител через шприцевую фильтровальную насадку Millex® 0,2 мкм или 0,45 мкм.
Высокий уровень фона	Недостаточная промывка	Увеличьте время и объем промывающей жидкости. Предварительно отфильтруйте все растворы, включая буфер для переноса, используя шприцевую фильтровальную насадку Millex® или фильтровальное устройство Steriflip®.
	Слишком высокая концентрация вторичных антител (конъюгированных с ферментом)	Увеличьте разведение антител.
	Взаимодействие типа «белок-белок»	Используйте Tween®-20 (0.05%) для промывки и в растворах для обнаружения, чтобы снизить взаимодействия типа «белок-белок» и усилить соотношение «сигнал-шум»
	Иммунодетекция на мембране переноса Immobilon®-P ^{5Q}	Увеличьте концентрацию или объем блокирующего агента, используемого для компенсации большей площади поверхности мембраны. Постоянный фон можно снизить добавлением к промывочному буферу NaCl (до 0.5M) и SDS (до 0.2%), а также увеличив время промывки до 2х часов.
	Реагенты низкого качества	Используйте высококачественные реагенты и воду Milli-Q®
	Кросс-реактивность между блокирующим агентом и антителом	Используйте другой блокирующий агент или детергент Tween®-20 в промывочном буфере
	Передержка пленки	Уменьшите время экспозиции
	Высыхание мембраны во время процесса инкубации	Используйте достаточные объемы, чтобы мембрана была покрыта во время инкубации
	Низкое качество антител	Используйте высококачественные аффинные очищенные антитела
Постоянный фон	Избыток реагентов для обнаружения	Полностью высушивайте блоты перед экспозицией
	Неспецифичное связывание	Используйте высокосолевую промывку (Протокол 3.4, стр 54)

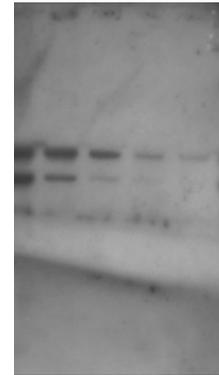
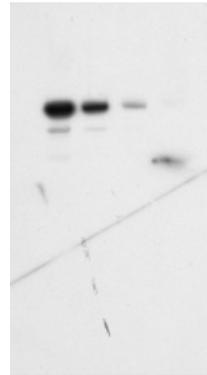
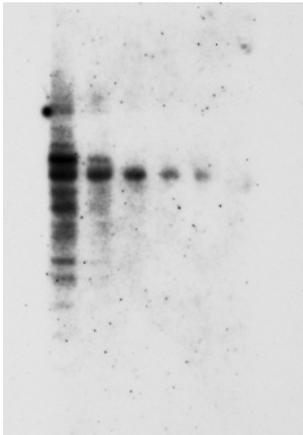
4. Иммунодетекция (продолжение)

Симптом	Возможная причина	Способ устранения
Высокий уровень фона (экспресс-иммунодетекция)	Мембрана смачивается в процессе экспресс-иммунодетекции	Уменьшите содержание детергента Tween®-20 (<0.04%) в растворителе для антител. Применяйте более мягкое потряхивание в процессе инкубации Промойте блот водой Milli-Q® после электропереноса, чтобы удалить все остатки SDS, принесенного из геля. Обязательно полностью просушите блот перед началом протокола детекции
	Мембрана была увлажнена метанолом перед иммунодетекцией	Не следует предварительно увлажнять мембрану
	Мембрана не была полностью просушена перед иммунодетекцией	Перед тем, как начинать процедуры, убедитесь, что мембрана полностью сухая
Неспецифичное связывание	Слишком высокая концентрация первичных антител	Увеличьте разведение первичных антител
	Слишком высокая концентрация вторичных антител	Увеличьте разведение вторичных антител
	Слишком высокая конц. антигенов	Уменьшите количество белка, заряжаемого в гель
Перевернутое изображение на пленке (белые полосы на темном фоне)	Слишком большое количество вторичных антител, конъюгированных с HRP	Уменьшите концентрацию вторичных антител, конъюгированных с HRP
Слабое обнаружение малых белков	Малые белки замаскированы большими блокирующими молекулами, такими как BSA	Обратите внимание на казеин или низкомолекулярный поливинилпирролидон (PVP). Возможно, следует уменьшить содержание ПАВ, таких как Tween® и Triton® X-100 Не превышайте положенного времени, предусмотренного на инкубацию с антителами и промывку

5. Флуоресцентная детекция

Симптом	Возможная причина	Способ устранения
Высокий уровень общего фона	Высокая фоновая флуоресценция мембраны блоттинга	Используйте мембрану для блоттинга Immobilon®-FL PVDF
	Блокирующие реагенты не оптимизированы для флуоресцентной детекции	Используйте шумоподавляющие реагенты Blok®-FL, оптимизированные для работы с флуоресцентными вестерн-блотами
Проблемы мультиплексирования	Дизайн эксперимента	Два антитела должны быть получены от разных видов –хозяев, чтобы они могли различаться по вторичным антителам разной специфичности. Перед тем как скомбинировать два первичных антитела, протестируйте схему полос на отдельных блотах, чтобы определить, где будут появляться полосы. Используйте перекрестно адсорбируемые вторичные антитела при двухцветном определении
Пестрый фон	Частицы пыли/порошка на обрабатываемом блоте	Работайте с блотами в неопудренных перчатках и чистите поверхность сканнера
Низкий сигнал	Влажный блот	Просушивание блота может улучшить силу сигнала. Блот можно сканировать после повторного увлажнения. Не пользуйтесь пластиковой оберткой Saran™ при сканировании блота
	Выцветание фотоблота	Хотя флуоресцентные краски обычно дают длительный эффект, некоторые из них могут легко выгорать на фотографиях. Для того, чтобы предотвратить выгорание фото, защитите мембрану от света во время инкубации вторичных антител и промывок, до тех пор, пока она не будет готова к сканированию. Храните проявленные блоты в темном месте для последующей визуализации.
	Ошибочная волна возбуждения	Следуйте инструкциям производителя краски по вопросам фотографирования блотов или используйте эмиссионный фильтр

Примеры и причины неудачных блотов

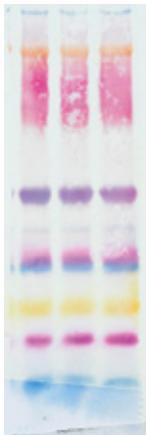


Отпечатки пальцев

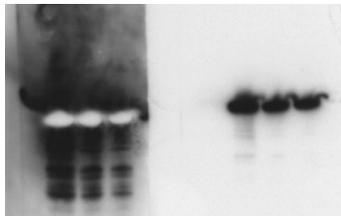
Царапины и отпечатки щипцов

Сложенные мембраны

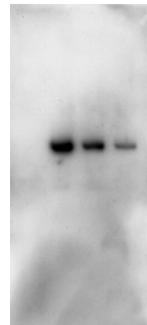
Пятнистый фон, вызванный недостаточной промывкой и/или нефилтрованным блокирующим раствором. Может быть улучшен путем фильтрации блокирующего раствора через шприцевой фильтр Millex® GP (0,2 мкм) и добавлением дополнительных промывок.



Пузырьки между мембраной и гелем SDS-PAGE, попавшие туда во время переноса.



Негативное (перевернутое) изображение на пленке, вызванное избытком вторичного антитела, конъюгированного с HRP. Обнаружение было улучшено путем увеличения разведения раствора вторичных антител в 10 раз. Блот слева инкубировали при разведении вторичных антител 1:5000, а блот справа инкубировали при разведении 1:50000.



Высокий уровень фона и темные края, вызванные недостаточной промывкой блота. Можно улучшить путем дополнительной и/или более длительной промывки или высокосолевым промывкой (Протокол 3.4, стр. 54.)

Глоссарий

1-D

Одномерный

2-D

Двумерный

Адсорбция

Процесс, в результате которого молекулы или частицы (например, белков) связываются с поверхностью (например, мембраны).

Анод

Положительно заряженный электрод в системе для электрофореза.

Блокирование

Метод, используемый для снижения неспецифического связывания антител при иммунодетекции; незанятые участки мембраны блокируются инертным белком, неионным детергентом или безбелковым блокирующим реагентом.

Блот

Микропористая мембрана с биомолекулами, адсорбированными на полимере.

Блоттинг

Процесс переноса белков, нуклеиновых кислот или биомолекул из геля на мембрану. Мембрана с иммобилизованными на ней белками называется вестерн-блотом.

Катод

Отрицательно заряженный электрод в системе электрофореза.

Хемилюминесцентная детекция

Метод иммунодетекции, приводящий к образованию видимого света на участке белка-мишени.

Хромогенная детекция

Метод иммунодетекции, приводящий к осаждению окрашенного осадка на участке белка-мишени.

Дот-блот

Блот, приготовленный путем фильтрации жидких образцов через мембрану с использованием гребенки дот-блоттинга (см. «Фильтрация»).

Изоэлектрическая точка (pI)

Величина pH, при которой суммарный электрический заряд молекулы, такой, как белок или аминокислота, равен нулю. Обычно это первое направление 2-D геля.

Деградация по Эдману

Процесс, в котором используется реагент Эдмана, фенилизотиоцианат (ФИТЦ), для последовательного удаления одной аминокислоты от N-конца белка. Полученную в результате химического процесса аминокислоту затем анализируют после отщепления ее от белка. Последовательный процессинг белка обеспечивает аминокислотную последовательность белка.

ELISA

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА); быстрый метод для выявления наличия и количества конкретного вещества. Он основан на взаимодействии антиген-антитело, когда антитело или антиген связывается ферментом, что и является средством обнаружения присутствия

Фильтрация

Нанесение образца непосредственно на мембрану. Растворенный образец пропускается через мембрану за счет создания вакуума; белки связываются с мембраной, а остальные компоненты образца проходят через нее.

Флуоресцентная детекция

Иммунологический анализ белка с использованием первичного или вторичного антитела, конъюгированного с флуоресцентным красителем.

Гель

Субстрат (подложка), обычно – полиакриламид, на котором происходит разделение образцов белка.

Иммуноблот

Вестерн-блот, анализируемый на белок-мишень с использованием специфических антител.

Иммунодетекция

Метод обнаружения белков с использованием специфических антител для определения местоположения белка-мишени, связанного с мембраной. Специфичность связывания антиген-антитело позволяет идентифицировать конкретный белок в сложном образце.

Изоэлектрическое фокусирование

Метод разделения белков на основе изоэлектрических точек. Обычно достигается с помощью электрофореза белков в стабилизированном градиенте pH, когда белки перемещаются к pH, соответствующему их изоэлектрической точке.

Полиакриламид

Разветвленный полимер акриламида, который используется для гель-электрофореза.

Первичное антитело

Первое антитело, используемое в протоколе иммунодетекции. Первичные антитела специфичны для антигена-мишени.

PVDF

Поливинилиденфторид (ПВДФ) – полимер, используемый для изготовления мембран для переноса Immobilon-P[®], Immobilon[®] - P^{5Q} и Immobilon[®] -FL (Иногда в литературе по блоттингу это сокращение ошибочно расшифровывается как поливинилидендифторид)

Экспресс-метод иммунодетекции

Более быстрый метод иммунодетекции, который устраняет необходимость (и риски) блокировки.

Повторное исследование

Процесс последовательного многократного повторения цикла блоттинга в процессе иммунодетекции.

Удерживание

В контексте очистки и повторного исследования иммуноблотов, удерживание относится к способности белка оставаться адсорбированным на поверхности мембраны в условиях, которые разрушают иммунные комплексы.

SDS

Додецилсульфат натрия (ДСН, также – лаурилсульфат натрия) – детергент, который связывается с белками, придавая им отрицательный суммарный заряд. Используется для денатурации белков в гель-электрофорезе. Также широко применяется для разрушения клеточных стенок и диссоциации белковых комплексов. SDS может быть заменен на додецилсульфат лития (LDS).

SDS-PAGE

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ)

Вторичное антитело

Второе антитело используется в протоколе иммунодетекции. Вторичное антитело является специфичным к первичному антителу и, как правило, конъюгировано с ферментом, используемым для усиления сигнала.

Полусухой перенос

Метод электропереноса, при котором классическая камера с буфером заменена слоями фильтровальной бумаги, смоченной буферным раствором; столь же эффективный, но более быстрый метод, по сравнению с электрофорезом в камере переноса (tank). В процессе переноса может быть использовано несколько буферных систем.

Слот-блот

Блот, приготовленный путем фильтрации жидких образцов через мембрану с использованием коллектора слот-блоттинга.

Спот-блоттинг

Блот, приготовленный вручную путем нанесения образца на мембрану.

Окрашивание

Техника используется для изготовления белковых полос видны на геле и блоттинга. Цветные пятна может быть обратимым или необратимым .

Очистка

Процесс удаления антител из мембраны перед следующим этапом иммунодетекции.

Субстрат (подложка)

Соединение, которое взаимодействует с ферментом, конъюгированным с вторичным антителом для получения детектируемого сигнала при иммунодетекции. Сигнал, как правило, проявляется в виде окрашенного осадка (хромогенных субстратов), либо электромагнитного излучения (свет от хемилюминесцентных или флуоресцентных субстратов).

Перенос в камере электрофореза

Классический метод электропереноса, при котором гель и мембрана полностью погружены в камеру с буфером; эффективный, но медленный метод.

Буфер(ы) для переноса

Буфер(ы), используемые в качестве химической среды для обеспечения переноса биомолекул из геля на мембрану .

Трансиллюминация

Метод неразрушающей обратимой визуализации, используется для того, чтобы сделать видимыми полосы белка на блотах. Полосы белка проявляются в виде светлых участков на темном поле при помещении на в темновую камеру.

Вакуумный блоттинг

Процесс переноса биомолекул из геля на мембрану с применением вакуума в качестве движущей силы; обычно не используется для белковых гелей.

Вестерн-блот

Блот, приготовленный путем переноса белка из полиакриламидного геля на мембрану

Литература:

Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends Biotechnol* 2002 May;20(5):215–23.

Aksamitiene E, Hoek JB, Kholodenko B, Kiyatkin A. Multistrip Western blotting to increase quantitative data output. *Electrophoresis*. 2007;28(18):3163–3173.

Bauer G. Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. *Clin Lab* 2001;47(5–6):223–30.

Beisiegel U. Protein blotting. *Electrophoresis* 1986;7:1–18.

Berggren K, Steinberg TH, Lauber WM, Carroll JA, Lopez MF, Chernokalskaya E, Zieske L, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF. A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports. *Anal Biochem* 1999;276(2):129–143.

Bickar D, Reid PD. A high-affinity protein stain for Western blots, tissue prints, and electrophoretic gels. *Anal Biochem* 1992;203(1):109–15.

Bienvenut WV, Sanchez JC, Karmime A, Rouge V, Rose K, Binz PA, Hochstrasser DF. Toward a clinical molecular scanner for proteome research: parallel protein chemical processing before and during Western blot. *Anal Chem* 1999;71(21):4800–7. Binz PA, Muller M, Walther D, Bienvenut WV, Gras R, Hoogland C, Bouchet G, Gasteiger E, Fabbretti R, Gay S, Palagi P, Wilkins MR, Rouge V, Tonella L, Paesano S, Rossellat G, Karmime A, Bairoch A, Sanchez JC, Appel RD, Hochstrasser DF. A molecular scanner to automate proteomic research and to display proteome images. *Anal Chem* 1999;71(21):4981–8.

Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein methods*. New York: Wiley-Liss; 1996. p 195–228.

Bolt MW, Mahoney PA. High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1997;247(2):185–92.

Bunai K, Nozaki M, Hamano M, Ogane S, Inoue T, Nemoto T, Nakanishi H, Yamane K. Proteomic analysis of acrylamide gel separated proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membranes following proteolytic digestion in the presence of 80% acetonitrile. *Proteomics* 003;3(9):1738–49.

Celis JE, Gromov P. High-resolution two-dimensional gel electrophoresis and protein identification using Western blotting and ECL detection. *EXS* 2000;88:55–67.

Cortese JD. Beyond film: laboratory imagers. *The Scientist* 2002;16(7):41.

Chen H, Chang GD. Simultaneous immunoblotting analysis with activity gel electrophoresis in a single polyacrylamide gel. *Electrophoresis* 2001;22(10):1894–9.

Dunn MJ. Detection of total proteins on Western blots of 2-D polyacrylamide gels. *Methods Mol Biol* 1999;112:319–29.

Elkon KB, Jankowski PW, Chu JL. Blotting intact immunoglobulins and other high-molecularweight proteins after composite agarosepolyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1984;140(1):208–13.

Литература (продолжение):

- Erickson PF, Minier LN, Lasher RS. Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunoautoradiographic detection of antigens. *J Immunol Methods* 1982;51(2):241–9.
- Eto M, Watanabe K, Moriyama T, Makino I. Apolipoprotein E phenotyping from plasma by isoelectric focusing and immunoblotting. *Tohoku J Exp Med* 1990;160(4):301–9.
- Fernandez J, DeMott M, Atherton D, Mische SM. Internal protein sequence analysis: Enzymatic digestion for less than 10 µg of protein bound to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes. *Anal Biochem* 1992;201(2):255–64.
- Gershoni JM. Protein blotting: a manual. *Meth Biochem Analysis* 1987;33:1–58.
- Gharahdaghi F, Kirchner M, Fernandez J, Mische SM. Peptide-mass profiles of polyvinylidene difluoride-bound proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in the presence of nonionic detergents. *Anal Biochem* 1996;233(1):94–9.
- Grässer FA, Sauder C, Haiss P, Hille A, König S, Göttel S, Kremmer E, Leinenbach HP, Zeppezauer M, Mueller-Lantzsch N. Immunological detection of proteins associated with the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A. *Virology*. 1993 Aug;195(2):550–60.
- Haugland RP. Handbook of fluorescent probes and research products. 9th edition. Eugene (OR): Molecular Probes, Inc.; 2002.
- Heermann KH, Gultekin H, Gerlich WH. Protein blotting: techniques and application in virus hepatitis research. *Ric Clin Lab* 1988;18(2–3):193–221.
- Henggh PN. Chemiluminescent detection methods. *TIBS* 1997;22:313–14.
- Iwamatsu A. S-carboxymethylation of proteins transferred onto polyvinylidene difluoride membranes followed by in situ protease digestion and amino acid sequencing. *Electrophoresis* 1992;13:142–7. Kurien BT, Scofield RH. Multiple immunoblots after non-electrophoretic bidirectional transfer of a single SDS-PAGE gel with multiple antigens. *J Immunol Methods* 1997;205(1):91–4.
- Kurien BT, Scofield RH. Protein blotting: a review. *J Immunol Methods* 2003; 274(1–2):1–15.
- Kyhse-Anderson J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biophys Biochem Methods* 1984;10:203–209.
- Lasne F. Double blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods* 2001;253:125–131.
- Lasne F. Double blotting: a solution to the problem of nonspecific binding of secondary antibodies in immunoblotting procedures. *J Immunol Methods* 2003;276:223–6.
- Lasne, F. et al., Detection of hemoglobin-based oxygen carriers in human serum for doping analysis: screening by electrophoresis. *Clin Chem* 2004;50:410–415.
- Leary JJ, Brigati DJ, Ward DC. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: bio-blots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80(13):4045–9.
- LeGendre N. Immobilon®-P transfer membrane: applications and utility in protein biochemical analysis. *BioTechniques* 1990;9:788.
- Mansfield M. Protein blotting using polyvinylidene fluoride membranes. In: Dunbar B, editor. *Protein blotting: a practical approach*. Oxford: IRL Press; 1994. p 33–45.
- Mansfield M. Rapid immunodetection of polyvinylidene fluoride membrane blots without blocking. *Anal Biochem* 1995;229(1):140–3.
- Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Biol Chem* 1987;262(21):10035–8.
- McKeon TA, Lyman ML. Calcium improves electrophoretic transfer of calmodulin and other small proteins. *Anal Biochem* 1991; 193:125–30.
- Merck Millipore. Immobilon®-P transfer membrane user guide. 2007 Jul. Billerica (MA). Merck Millipore Product Lit. No. PR02531. 24 p.
- Mozdzanowski J, Speicher DW. Microsequence analysis of electroblotted proteins. *Anal Biochem* 1992;207(1):11–8.
- Mylonakis E, Paliou M, Lally M, Flanigan TP, Rich JD. Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches. *Am J Med* 2000; 109(7):568–76.
- Otter T, King SM, Witman GB. A two-step procedure for efficient electrotransfer of both high-molecular-weight (>400,000) and low-molecular-weight (<20,000) proteins. *Anal Biochem* 1987;162:370–7.
- Patton WF, Lam L, Su Q, Lui M, Erdjumentbromage H, Tempst P. Metal chelates as reversible stains for detection of electroblotted proteins: application to protein microsequencing and immunoblotting. *Anal Biochem* 1994; 220(2):324–35
- Peferoen M, Huybrechts R, De Loof A. Vacuum-blotting: a new simple and efficient transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to nitrocellulose. *FEBS Letters* 1982;145(2):369–72.

- Pluskal M, Przekop M, Kavoniam M, Hicks D, Vecoli C. Immobilon® PVDF transfer membrane: a new membrane substrate for Western blotting. *Biotechniques* 1986;4(3):272–82.
- Poland J, Bohme A, Schubert K, Sinha P. Revisiting electroblotting of immobilized pH gradient gels: a new protocol for studying post-translational modification of proteins. *Electrophoresis* 2002;23(24):4067–71.
- Reese G, Schmechel D, Ayuso R, Lehrer SB. Grid-immunoblotting: a fast and simple technique to test multiple allergens with small amounts of antibody for cross-reactivity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;756(1–2):151–6.
- Reig JA, Klein DC. Submicron quantities of unstained proteins are visualized on polyvinylidene difluoride membranes by transillumination. *Applied and Theoretical Electrophoresis* 1988;1:59–60.
- Rudolph C, Adam G, Simm A. Determination of copy number of c-Myc protein per cell by quantitative Western blotting. *Anal Biochem* 1999;269(1):66–71.
- Schafer-Nielsen C, Svendsen PJ, Rose C. Separation of macromolecules in isotachopheresis involving single or multiple counterions. *J Biochem Biophys Methods* 1980; 3(2):97–128.
- Schilling M, Maiwald T, Bohl S, et al. Quantitative data generation for systems biology: the impact of randomisation, calibrators and normalisers. *Syst Biol (Stevenage)* 2005;152(4):193–200
- Schilling M, Maiwald T, Bohl S, et al. Computational processing and error reduction strategies for standardized quantitative data in biological networks. *Febs J.* 2005;272(24):6400–6411.
- Sharma SK, Carew TJ. Inclusion of phosphatase inhibitors during Western blotting enhances signal detection with phosphospecific antibodies. *Anal Biochem* 2002; 307(1):187–9.
- Shojaee N, Patton WF, Lim MJ, Shepro D. Pyrogallol red-molybdate: a reversible, metal chelate stain for detection of proteins immobilized on membrane supports. *Electrophoresis* 1996;17(4):687–93.
- Silva cm, Tully DB, Petch LA, Jewell CM, Cidowski JA. Application of a protein-blotting procedure to the study of human glucocorticoid receptor interactions with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Apr;84(7):1744–8.
- Sloane AJ, Duff JL, Wilson NL, Gandhi PS, Hill CJ, Hopwood FG, Smith PE, Thomas ML, Cole RA, Packer NH, Breen EJ, Cooley PW, Wallace DB, Williams KL, Gooley AA. High throughput peptide mass fingerprinting and protein macroarray analysis using chemical printing strategies. *Mol Cell Proteomics* 2002;1(7):490–9.
- Stahl D, Lacroix-Desmazes S, Mouthon L, Kaveri SV, Kazatchkine MD. Analysis of human self-reactive antibody repertoires by quantitative immunoblotting. *J Immunol Methods* 2000; 240(1–2):1–14.
- Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Methods* 1989;119(2):153–87.
- Swank MW, Kumar V, Zhao J, Wu GY. A novel method of loading samples onto mini-gels for SDS-PAGE: Increased sensitivity and Western blots using sub-microgram quantities of protein. *J Neurosci Methods.* 2006;158:224–233.
- Thompson D, Larson G. Western blots using stained protein gels. *BioTechniques* 1992; 12(5):656–8.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(9):4350–4.
- Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting – current status and outlook. *J Immunol Methods* 1984;72(2):313–40.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989;27(8):495–501.
- Van Dam AP, Van den Brink HG, Smeenk RJT. Technical problems concerning the use of immunoblots for the detection of antinuclear antibodies. *J Immunol Methods* 1990;129(1):63–70.
- Van Dyke KK, Van Dyke R, editors. Luminescence immunoassay and molecular applications, Boca Raton (FL): CRC Press; 1990. p 61–5.
- Wang R, Thompson JE. Detection of ATP competitive protein kinase inhibition by Western blotting. *Anal Biochem* 2001;299:110–2.
- Zampieri S, Ghirardello A, Doria A, Tonello M, Bendo R , Rossini K , Gambari PF. The use of Tween®-20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J Immunol Methods* 2000; 239(1–2):1–11.

Патенты:

- U.S. Pat. No. 6,632,339, issued to W.V. Bienvenut et al. on October 14, 2003.
- U.S. Pat. App. Pub. No. 2002/0136668 (published September 26, 2002), filed by D. Wallace et al. on December 18, 2001.
- International Patent Application No. PCT/AU98/00265 of A. Gooley et al. (published October 22, 1998 as International Publication No. WO 98/47006).
- International Patent Application No. PCT/FR01/01331 of Laboratoire National de Dépistage du Dopage with Hospices Civils de Lyon which also holds the patent (2 786 273).

Информация для заказа

2X Буфер для образцов (2105)

Компонент	Кат. No.
130 Tris HCl pH 8.0	9310 ■
20% (v/v) Glycerol	4750 ■
4.6% (w/v) SDS	7910 ■
0.02% Bromophenol blue	2830 ■
2% DTT	3860 ■

8X Буфер для разделяющего геля: 100 мл

Компонент	Кат. No.
0.8 g SDS (add last)	7910 ■
36.3 g Tris base (=3 M)	9210 ■

Довести pH полученного раствора с помощью концентрированной соляной кислоты до значения 8.8.

4X Буфер для концентрирующего геля: 100 мл

Компонент	Кат. №
0.4 g SDS (add last)	7910 ■
6.05 g Tris base (=0.5 M)	9210 ■

Довести pH до 6.8

10X буфер для прогона гелей: 1 л

Компонент	Кат. №
30.3 g Tris base (=0.25 M)	9210 ■
144 g Glycine(=1.92 M)	4810 ■
10 g SDS (=1%, add last)	7910 ■

Не изменять pH!

10X Буфер для переноса: 1 л (Кат. № 9000, готовый к использованию)

Компонент	Кат. №
30.3 g Tris base (=0.25 M)	9210 ■
144 g Glycine(=1.92 M)	4810 ■

pH должна быть 8.3, не изменять

Промывочный буфер

Компонент	Кат. №
OmniPur® 10X PBS, Premixed Powder	6508 ■

■ Продукты, доступные на сайте www.merckchemicals.com

Мембраны для переноса Immobilon®

Описание		Количество	Кат. №
Immobilon®-P: PVDF 0,45 мкм	7 × 8.4 см	50/уп.	IPVH07850
	26.5 см × 3.75 м	1 рулон	IPVH00010
Immobilon®-FL: PVDF 0,45 мкм	7 × 8.4 см	10/уп.	IPFL07810
	26.5 см × 3.75 мм	1 рулон	IPFL00010
Immobilon®-P ⁵⁰ : PVDF 0,2 мкм	7 × 8.4 см	50/уп.	ISEQ07850
	26.5 см × 3.75 м	1 рулон	ISEQ00010

Система SNAP i.d.® 2.0

Описание	Кат. №
Система SNAP i.d.® 2.0 мини (7.5 × 8.4 см)	SNAP2MINI
Система SNAP i.d.® 2.0 миди (8.5 × 13.5 см)	SNAP2MIDI
Система SNAP i.d.® 2.0 мини и миди (7.5 × 8.4 см and 8.5 × 13.5 см)	SNAP2MM

Расходные материалы SNAP i.d.® 2.0

Описание	Количество	Кат. №
SNAP i.d.® 2.0 мини блот холдеры (7.5 × 8.4 см)	100/уп.	SNAP2BHMN0100
SNAP i.d.® 2.0 миди блот холдеры (8.5 × 13.5 см)	100/уп.	SNAP2BHMDO100

Аксессуары для SNAP i.d.® 2.0

Описание	Количество	Кат. №
Лоток для сбора антител SNAP i.d.® 2.0	20/уп.	SNAPABTR
SNAP i.d.® 2.0 Блот роллер	1/уп.	SNAP2RL
SNAP i.d.® 2.0 Рамки для мини блот холдера (двойной пакет)	2/уп.	SNAP2FRMN02
SNAP i.d.® 2.0 Рамки для миди блот холдера (двойной пакет)	2/уп.	SNAP2FRMD02
SNAP i.d.® 2.0 Рамки для мини блот холдера (одинарный пакет)	1/уп.	SNAP2FRMN01
SNAP i.d.® 2.0 Рамки для миди блот холдера (одинарный пакет)	1/уп.	SNAP2FRMD01

Уменьшающие шум реагенты Bløk®

Описание	Метод определения	Количество	Кат. №
Bløk®-CH Reagent	Хемилюминесцентная детекция	500 мл	WBAVDCH01
Bløk®-FL Reagent	Флюоресцентная детекция	500 мл	WBAVDFL01
Bløk®-PO Reagent	Детекция фосфорилированных протеинов	500 мл	WBAVDPO01

Субстраты Luminata™ Western HRP

Описание	Количество	Кат. №
Субстраты Luminata™ Classico Western HRP	500 мл	WBLUC0500
Субстраты Luminata™ Crescendo Western HRP	500 мл	WBLUR0500
Субстраты Luminata™ Forte Western HRP	500 мл	WBLUF0500

Реактивы усиления Вестерн-блоттинга

Описание	Количество	Кат. №
SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit	400 мл	407207 ■

000 «Диаэм»

Москва
ул. Магаданская, д. 7, к. 3 ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ sales@dia-m.ru

www.dia-m.ru

С.-Петербург
+7 (812) 372-6040
spb@dia-m.ru

Новосибирск
+7 (383) 328-0048
nsk@dia-m.ru

Воронеж
+7 (473) 232-4412
vrn@dia-m.ru

Йошкар-Ола
+7 (927) 880-3676
nba@dia-m.ru

Красноярск
+7 (923) 303-0152
krsk@dia-m.ru

Казань
+7 (843) 210-2080
kazan@dia-m.ru

Ростов-на-Дону
+7 (863) 303-5500
rnd@dia-m.ru

Екатеринбург
+7 (912) 658-7606
ekb@dia-m.ru

Кемерово
+7 (923) 158-6753
kemeroovo@dia-m.ru

Армения
+7 (094) 01-0173
armenia@dia-m.ru

